

DOCKET NO.: 263859US0X PCT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Alain SANSON, et al.

SERIAL NO.: NEW U.S. PCT APPLICATION

FILED: HERewith

INTERNATIONAL APPLICATION NO.: PCT/FR03/02027

INTERNATIONAL FILING DATE: June 30, 2003

FOR: LABELLED PEPTIDES HAVING AFFINITY FOR A PHOSPHOLIPID AND USES

REQUEST FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. 119
AND THE INTERNATIONAL CONVENTION

Commissioner for Patents
Alexandria, Virginia 22313

Sir:

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicant claims as priority:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NO</u>	<u>DAY/MONTH/YEAR</u>
France	02 08204	01 July 2002

Certified copies of the corresponding Convention application(s) were submitted to the International Bureau in PCT Application No. PCT/FR03/02027. Receipt of the certified copy(s) by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.

Respectfully submitted,
OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.



Norman F. Oblon
Attorney of Record
Registration No. 24,618
Surinder Sachar
Registration No. 34,423

Customer Number

22850

(703) 413-3000
Fax No. (703) 413-2220
(OSMMN 08/03)

BEST AVAILABLE COPY

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

BREVATOME

21 OCT. 2003

PCT

3, rue du Docteur Lancereaux
75008 PARISNOTIFICATION RELATIVE
A LA PRESENTATION OU A LA TRANSMISSION
DU DOCUMENT DE PRIORITE

(instruction administrative 411 du PCT)

Expéditeur : le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

AUDIER, Philippe
c/o BREVATOME
3, rue du Docteur Lancereaux
F-75008 PARIS
FRANCE

Date d'expédition (jour/mois/année) 15 octobre 2003 (15.10.03)	
Référence du dossier du déposant ou du mandataire B 14023.3 EE	NOTIFICATION IMPORTANTE
Demande internationale no PCT/FR03/02027	Date du dépôt international (jour/mois/année) 30 juin 2003 (30.06.03)
Date de publication internationale (jour/mois/année) Pas encore publiée	Date de priorité (jour/mois/année) 01 juillet 2002 (01.07.02)
Déposant COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE etc	

1. La date de réception (sauf lorsque les lettres "NR" figurent dans la colonne de droite) par le Bureau international du ou des documents de priorité correspondant à la ou aux demandes énumérées ci-après est notifiée au déposant. Sauf indication contraire consistant en un astérisque figurant à côté d'une date de réception, ou les lettres "NR", dans la colonne de droite, le document de priorité en question a été présenté ou transmis au Bureau international d'une manière conforme à la règle 17.1.a) ou b).
2. Ce formulaire met à jour et remplace toute notification relative à la présentation ou à la transmission du document de priorité qui a été envoyée précédemment.
3. Un astérisque(*) figurant à côté d'une date de réception dans la colonne de droite signale un document de priorité présenté ou transmis au Bureau international mais de manière non conforme à la règle 17.1.a) ou b). Dans ce cas, l'attention du déposant est appelée sur la règle 17.1.c) qui stipule qu'aucun office désigné ne peut décider de ne pas tenir compte de la revendication de priorité avant d'avoir donné au déposant la possibilité de remettre le document de priorité dans un délai raisonnable en l'espèce.
4. Les lettres "NR" figurant dans la colonne de droite signalent un document de priorité que le Bureau international n'a pas reçu ou que le déposant n'a pas demandé à l'office récepteur de préparer et de transmettre au Bureau international, conformément à la règle 17.1.a) ou b), respectivement. Dans ce cas, l'attention du déposant est appelée sur la règle 17.1.c) qui stipule qu'aucun office désigné ne peut décider de ne pas tenir compte de la revendication de priorité avant d'avoir donné au déposant la possibilité de remettre le document de priorité dans un délai raisonnable en l'espèce.

<u>Date de priorité</u>	<u>Demande de priorité n°</u>	<u>Pays, office régional ou office récepteur selon le PCT</u>	<u>Date de réception du document de priorité</u>
01 juil 2002 (01.07.02)	02 08204	FR	13 octo 2003 (13.10.03)

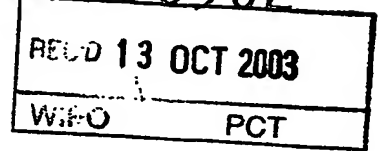
Bureau international de l'OMPI
34, chemin des Colombettes
1211 Genève 20, Suisse

no de télécopieur: (41-22) 338.71.40

Fonctionnaire autorisé:

Najib BEN HELAL (Fax 338-8995)

no de téléphone: (41-22) 338 8268



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 22 SEP. 2003

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIÈGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr



INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

bis, rue de Saint Pétersbourg

800 Paris Cedex 08

téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

ret dépôt

BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354*01

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 1/2

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 W /260999

Réservé à l'INPI

ÉMISSION DES PIÈCES

DATE

1 JUIL 2002

LEU

75 INPI PARIS

N° D'ENREGISTREMENT

0208204

NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE

PAR L'INPI

- 1 JUIL. 2002

Vos références pour ce dossier

(facultatif) B 14023.3/EE BD 1405 UNIVERSITE PARIS VI

1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

BREVATOME

3 rue du Docteur Lancereaux

75008 PARIS

Confirmation d'un dépôt par télécopie

☐ N° attribué par l'INPI à la télécopie

2 NATURE DE LA DEMANDE

Cochez l'une des 4 cases suivantes

Demande de brevet

☒

Demande de certificat d'utilité

☐

Demande divisionnaire

☐

Demande de brevet initiale

N°

Date / /

ou demande de certificat d'utilité initiale

N°

Date / /

Transformation d'une demande de

brevet européen *Demande de brevet initiale*

☐

N°

Date / /

3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)

PEPTIDES MARQUES AYANT UNE AFFINITÉ POUR UN PHOSPHOLIPIDE ET UTILISATIONS.

4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ

OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE

LA DATE DE DÉPÔT D'UNE

DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE

Pays ou organisation

Date / /

N°

Pays ou organisation

Date / /

N°

Pays ou organisation

Date / /

N°

☐ S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»

5 DEMANDEUR

☒ S'il y a d'autres demandeurs, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»

Nom ou dénomination sociale

COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE

Prénoms

Forme juridique

Etablissement public de caractère Scientifique, Technique et Industriel

N° SIREN

Code APE-NAF

Adresse

Rue

31-33 rue de la Fédération

Code postal et ville

75752

PARIS 15ème

Pays

FRANCE

Nationalité

FRANCAISE

N° de téléphone (facultatif)

N° de télécopie (facultatif)



BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 2/2

REMISE DES PIÈCES DATE 1 JUIL 2002 LIEU 75 INPI PARIS N° D'ENREGISTREMENT 0208204 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		Réservé à l'INPI	
Vos références pour ce dossier : <i>(facultatif)</i>		B 14023.3/EE BD 1405 UNIVERSITE PARIS VI	
6 MANDATAIRE			
Nom		AUDIER	
Prénom		Philippe	
Cabinet ou Société		BREVATOME 422.5/S002	
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel		7068 du 12.06.98	
Adresse	Rue	3 rue du Docteur Lancereaux	
	Code postal et ville	75008	PARIS
N° de téléphone <i>(facultatif)</i>		01.53.83.94.00	
N° de télécopie <i>(facultatif)</i>		01.45.63.83.33	
Adresse électronique <i>(facultatif)</i>		brevets.patents@brevaalex.com	
7 INVENTEUR (S)			
Les inventeurs sont les demandeurs		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée	
8 RAPPORT DE RECHERCHE		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)	
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Paiement échelonné de la redevance		Paiement en trois versements, uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention <i>(joindre un avis de non-imposition)</i> <input type="checkbox"/> Requête antérieurement à ce dépôt <i>(joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence) :</i>	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes		1	
10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) P. AUDIER 422-5 S/002		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI 	



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354*01

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Page suite N° 1.../1..

Réserve à l'INPI

REMISE DES PIÈCES

DATE 1 JUIL 2002

LIEU 75 INPI PARIS

N° D'ENREGISTREMENT

0208204

NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

08 829 W / 260899

Vos références pour ce dossier (facultatif)

B14023.3/EE BD1405

☒ DÉCLARATION DE PRIORITÉ
OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE
LA DATE DE DÉPÔT D'UNE
DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE

Pays ou organisation

Date / /

N°

Pays ou organisation

Date / /

N°

Pays ou organisation

Date / /

N°

☒ DEMANDEUR

Nom ou dénomination sociale

UNIVERSITE Pierre et Marie CURIE(Paris VI)

Prénoms

Forme juridique

N° SIREN

Code APE-NAF

Adresse

Rue

4 Place Jussieu Tour Centrale

Code postal et ville

75252 PARIS CEDEX 05

Pays

FRANCE

Nationalité

FRANCAISE

N° de téléphone (facultatif)

N° de télécopie (facultatif)

Adresse électronique (facultatif)

☒ DEMANDEUR

Nom ou dénomination sociale

Prénoms

Forme juridique

N° SIREN

Code APE-NAF

Adresse

Rue

Code postal et ville

Pays

Nationalité

N° de téléphone (facultatif)

N° de télécopie (facultatif)

Adresse électronique (facultatif)

☒ SIGNATURE DU DEMANDEUR
OU DU MANDATAIRE
(Nom et qualité du signataire)

P. AUDIER 422-5 S/002

VISA DE LA PRÉFECTURE
OU DE L'INPI

PEPTIDES MARQUES AYANT UNE AFFINITE POUR UN
PHOSPHOLIPIDE ET UTILISATIONS

DESCRIPTION

5

DOMAINE TECHNIQUE

La présente invention se rapporte à une famille de peptides marqués par le Fluor-18 qui ont des affinités améliorées pour les phospholipides, et à
10 leurs utilisations.

De manière générale, les peptides de la présente invention sont utiles pour la reconnaissance spécifique de molécules lipidiques. Ils sont utilisables pour l'ingénierie et la création de composés de
15 reconnaissance et de séquestration de lipides notamment de lipides chargés négativement, tels que les phosphatidylsérines, les acides phosphatidiques et lyso-phosphatidiques, les phosphatidylglycérols, les cardiolipines et les sphingosines-1-phosphates.

20 Les lipides précités jouent un rôle important notamment dans la signalisation cellulaire et peuvent être présents à la surface externe des membranes des cellules et/ou circuler dans le milieu sanguin à la suite d'événements pathologiques très divers.

25 Divers événements cellulaires aboutissent à l'apparition de lipides chargés négativement et notamment de phosphatidylsérines (PS) à la surface externe des cellules, ces événements peuvent résulter soit d'une altération fortuite ou pathologique de la
30 cellule, soit d'un événement cellulaire programmé telle que la mort cellulaire ou apoptose. L'apparition de PS à la surface externe des cellules constitue donc un "message primaire" important témoignant de l'existence

d'un dysfonctionnement. Dans le cas du processus de coagulation sanguine, le mécanisme est bien décrit : l'altération des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins, soit pour des raisons accidentelles, soit
5 pour des raisons pathologiques plus complexes, provoque l'apparition de ce message PS à la surface externe des cellules en contact avec le milieu sanguin. Ce message est immédiatement reconnu par certaines protéines circulantes qui déclenchent alors une cascade
10 d'événements aboutissant au phénomène de coagulation sanguine bien connu.

L'invention tire profit de la propriété des peptides marqués qu'elle fournit, de se lier, en présence ou non de calcium, aux lipides et notamment à
15 ceux chargés négativement, pour la mise au point de composés utilisables comme outils de recherche et de diagnostic dans le domaine de la reconnaissance des effecteurs lipidiques et de la détection de l'apoptose, des troubles de la coagulation sanguine, du choc
20 septique et des pathologies inflammatoires aiguës en particulier.

Les peptides marqués de l'invention sont couplés à un halogène radioactif, émetteur à positons, qui est le fluor ^{18}F . Avec ces peptides marqués, il est donc
25 possible par exemple de détecter des cellules apoptotiques ou de reconnaître des microdomaines membranaires chargés négativement.

Ils peuvent être utilisés pour une détection "in vitro" de pathologies impliquant l'apparition de
30 centres exposant des lipides chargés négativement à la surface de cellules et/ou la libération dans le sang de microvésicules.

Les peptides marqués de la présente invention peuvent également être utilisés pour la détection in vivo et l'imagerie des foyers apoptotiques, de zones thrombotiques, et de manière générale de centres ~~exposant des lipides chargés négativement à la surface~~ de cellules et/ou la libération dans le sang de microvésicules, par exemple au moyen d'images scintigraphiques, acquises en tomographie par émission de positons (PET pour « Positron Emission Tomography »).

D'autres applications apparaîtront encore à l'homme du métier à la lecture de la description qui suit.

15 ETAT DE LA TECHNIQUE

Une famille de protéines, appelées annexines, ont été décrites dans l'art antérieur comme présentant un ancrage fonctionnel réversible à la membrane cellulaire, régulé par la concentration en calcium et la présence de phospholipides anioniques. Les annexines constituent une famille de protéines exprimées dans des tissus très divers, aussi bien chez les animaux que chez les plantes. Il semble qu'elles ne sont ni exprimées chez la bactérie, ni chez la levure.

25 La structure des annexines comporte quatre domaines d'environ 70 acides aminés, ou résidus, très moyennement homologues en séquence mais de topologie quasiment identique.

Dans le document WO 92/19279, J. TAIT décrit des conjugués ayant une affinité pour des phospholipides. Il décrit en particulier l'utilisation d'une annexine, en particulier de l'annexine V, pour fabriquer un

conjugué actif utilisable en tant qu'agent thrombolytique.

Malheureusement, le composé décrit dans ce document et préparé à partir de l'annexine entière par
5 un procédé de recombinaison génétique, possède de nombreux inconvénients qui sont notamment un rendement faible, un coût de fabrication élevé. Les inconvénients majeurs sont surtout l'obtention d'un conjugué fragile du fait de sa topologie complexe conduisant à un
10 dépliement irréversible. En outre, ces molécules présentent une toxicité majeure pour le rein et le cœur.

Les présents inventeurs ont décrit dans la demande WO-A-00/20453 une première famille de peptides
15 palliant les inconvénients précités et présentant une affinité pour les phospholipides et une stabilité améliorées.

Par ailleurs, on sait que pour une utilisation dans la recherche ou le diagnostic les
20 macromolécules, telles que les protéines ou encore les peptides peuvent être couplés à une molécule de marquage permettant leur détection, cette molécule de marquage peut être, par exemple, une molécule fluorescente, des particules d'or, un composé
25 paramagnétique ou une molécule portant un radioélément.

Les protéines ont été marquées de manière radioactives par des radioisotopes, de l'iode et divers radioisotopes de métaux, tels que le technétium, l'indium et le gallium. Plus récemment, les protéines
30 ont été marquées avec du fluor-18.

Par exemple, les peptides couplées à des radioéléments, tels que le fluor, permettent une détection « in vivo » de la localisation des zones

thrombotiques lors d'accidents vasculaires de toutes sortes, en particulier des foyers apoptatiques et inflammatoires, en utilisant des systèmes d'imagerie.

Ainsi, les atomes radioactifs émetteurs de positons à durée de vie courte et notamment le ^{18}F peuvent, en particulier, être détectés par les appareils de tomographie par émission de positons (TEP) (PET ou « Positon Emission Tomography »).

Le marquage radioactif par le fluor-18, pose, notamment du fait de la très courte période du fluor-18 (voisine de 109,8 minutes) des problèmes spécifiques qui font que le marquage par le fluor-18 est fondamentalement différent de celui avec les autres halogènes, tels que l'iode.

Le couplage précité peut être réalisé par toutes les techniques classiques de chimie organique connues de l'homme du métier, et par la synthèse de marqueurs de protéines et de peptides portant un ou plusieurs atomes radioactifs à durée de vie courte en particulier le ^{18}F . Ce marqueur est généralement constitué, d'une part, d'une partie capable de recevoir, par exemple, un atome de ^{18}F et, d'autre part, d'une partie comportant une fonction classique quelconque de liaison à la macromolécule, par exemple, à la protéine.

Ces marqueurs doivent répondre à l'exigence d'une synthèse rapide et facile, car du fait de la courte durée de vie des radio isotopes tels que le ^{18}F , la durée de synthèse ne doit pas généralement excéder quelques heures.

En outre, cette synthèse, du fait de la haute radioactivité des composés mis en œuvre, doit pouvoir être réalisée par des moyens robotisés.

Ainsi, les procédés pour le marquage de protéines ou de peptides avec le fluor-18 font-ils appel à des marqueurs encore appelés « conjugués » ou « synthon » marqués, qui sont classés en trois familles principales, selon qu'ils réagissent avec les groupes amines, les groupes sulfhydryles, ou les groupes carbohydrates des macromolécules, tels que les protéines et peptides.

Parmi les composés ou conjugués réagissant avec les groupes amino, on peut citer les imidates, tels que le 3- ^{18}F fluoro-5-nitrobenzoimide, qui réagissent, par exemple, avec le groupe $\epsilon\text{-NH}_2$ de la lysine pour se lier à une protéine ; les esters activés, tels que le N-succinimidyl- ^{18}F fluorobenzoate ; les acides carboxyliques, tels que l'acide N-(4- ^{18}F fluorobenzoïque) ; les aldéhydes, telles que la 4- ^{18}F pentafluorobenzaldéhyde et les isothiocyanates, tels que le 4-(^{18}F fluorométhylphénylisothiocyanate).

Les halogénures activés, tels que le bromure de (4- ^{18}F fluorophénacyle), réagissent avec les groupes amino, tels que le groupe $\epsilon\text{-NH}_2$ de la lysine ou le groupe -SH de la cystéine.

Les amines, telles que la 1-(4-(^{18}F fluorométhyl)benzoyl)-aminobutane-4-amine réagissent avec les groupes CO_2H , par exemple de l'acide glutamique ou de l'acide aspartique ou avec les groupes CHO des glycoprotéines.

Les nitrènes avec des centres actifs photochimiques, tels que le fluorure ^{18}F d'azidophénacyle réagissent aussi avec les groupes amino, par exemple le groupe $\epsilon\text{-NH}_2$ de la lysine.

Le procédé le plus efficace et le plus décrit pour marquer les protéines et peptides est celui qui met en œuvre des acides activés, mais c'est aussi le procédé qui présente la non-spécificité la plus grande

5 car tous les sites nucléophiles des aminoacides des protéines ou peptides vont réagir avec le marqueur, conjugué, ou synthon marqué.

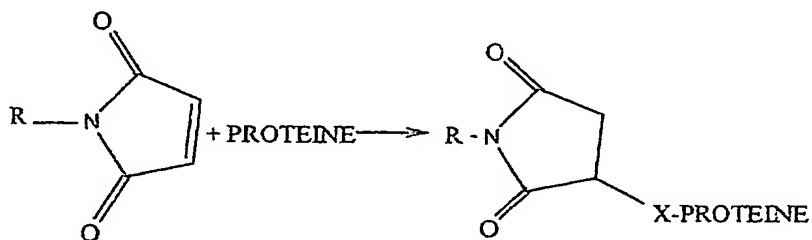
Deux procédés plus spécifiques pour marquer les peptides et les nucléotides présentent une bonne
10 spécificité vis-à-vis des atomes de soufre, par exemple de la cystéine pour les peptides et d'une fonction phosphoro-thioate pour les nucléotides.

Il s'agit, tout d'abord, des procédés mettant en œuvre des « synthons » haloacétamides, qui, bien que
15 satisfaisants, présentent l'inconvénient d'être très lents et donc peu adaptés au ^{18}F , du fait de la période de celui-ci.

Il s'agit ensuite des procédés mettant en jeu des maléimides activés, qui peuvent se fixer sur les
20 groupes SH avec une très bonne spécificité car la réaction est très lente vis-à-vis, par exemple des sites $\varepsilon\text{-NH}_2$ de la lysine.

Le schéma de la réaction impliquant le groupe maléimido est le suivant, dans le cas d'une protéine :

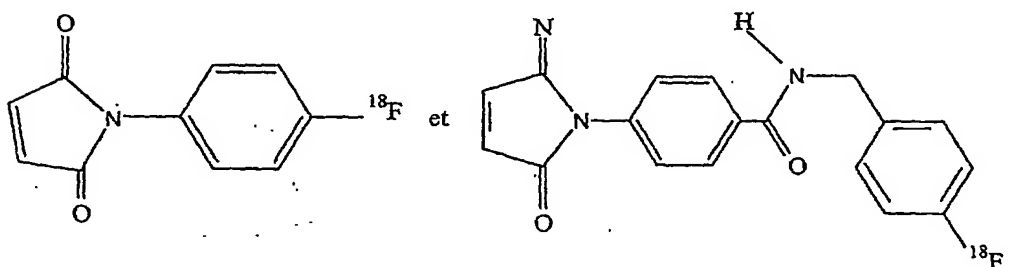
25



dans laquelle X représente -S-.

Pour tout marquage, quel qu'en soit le type, les molécules comprenant un radical maléimide sont, actuellement considérées comme étant les meilleures, pour ce qui est de leur réactivité avec les macromolécules, telles que les peptides ou les protéines.

Le document de SHIUE C.-Y. et al., J. Label Compounds Radiopharm 26 : 278-280 (1988), décrit les composés :



Le premier de ces composés n'est pas facile à marquer avec du fluor-18 à haute activité spécifique.

En effet, seul le fluor F_2 permettrait un marquage facile de « type iode » et il se trouve précisément que F_2 est généralement un produit à basse activité spécifique.

En particulier, le F_2 ne convient pas à la fabrication de composés dits « radiotraceurs » qui sont, préférentiellement, visés selon l'invention, tout simplement parce que la masse injectée de molécule marquée devient importante et que, alors, le principe de base régissant ce « traceur », à savoir l'occupation extrêmement faible (par exemple, inférieure à 5 %) des sites récepteurs, n'est pas respecté.

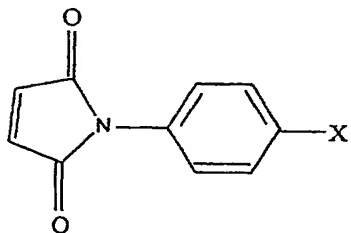
En outre, la synthèse du premier de ces composés est difficile, elle est, en effet, réalisée en quatre étapes nécessitant une durée importante avec des rendements très faibles, et des transformations

5 chimiques relativement complexes. Ce procédé n'est donc pas susceptible d'être aisément automatisé.

Le second des composés cités dans le document de SHIUE et al. comporte une chaîne amide qui n'est pas chimiquement très solide et qui est facilement clivée,
10 rompue, in vivo.

Sa mise en œuvre pour des applications de diagnostic n'est donc pas envisageable. En outre, la synthèse de ce second composé comprend trois étapes et le rendement final est faible, voisin, par exemple, de
15 10% ("EOB" "End of Bombardment" en anglais, c'est-à-dire en fin d'irradiation).

Le document US-A-4 735 792 est relatif à des molécules de formule :



20

dans laquelle X est un halogène radioactif choisi parmi le brome-75, le brome-76, le brome -82, l'iode-123, l'iode-125, l'iode-131 et le fluor-18.

25 Toutefois, seule la molécule marquée à l'iode-125 est effectivement préparée.

La préparation d'une molécule marquée au fluor-18 n'est ni mentionnée, ni évoquée, et les remarques déjà effectuées ci-dessus, en ce qui concerne le premier

composé du document de SHIUE et al., s'appliquent aussi dans le cadre du document US-A-4 735 792.

L'homme du métier, à la lecture de ce document, ne possède aucune information lui permettant de préparer
5 spécifiquement un composé marqué au fluor-18 et s'il envisage de le faire, il mettrait en œuvre du F_2 et aboutirait ainsi à un composé de faible activité spécifique, inutilisable en imagerie « PET ».

On peut en outre, considérer que la chimie mise en
10 œuvre pour fabriquer le composé fluoré du document US-A-4 735 792 est une chimie complexe et longue.

EXPOSE DE L'INVENTION

La présente invention a précisément pour but de
15 fournir une nouvelle famille de peptides, marqués par un halogène radioactif qui est fluor ^{18}F grâce à un nouveau composé de marquage, le peptide ayant une affinité pour les lipides, en particulier pour les phospholipides, plus spécifique et encore améliorée par
20 rapport aux produits de l'art antérieur ; et le composé de marquage ayant, entre autres, une forte réactivité, une grande sélectivité en particulier vis-à-vis des atomes de soufre tels que ceux des fonctions thiols des cystéines, et une bonne activité spécifique et ledit
25 composé de marquage pouvant en outre être fabriqué par un procédé simple, fiable, facilement automatisable, rapide et de courte durée.

Les peptides de l'invention présentent en outre les avantages d'être plus stables chimiquement que les
30 composés de l'art antérieur et de pouvoir être fabriqués de manière reproductible, avec un rendement élevé et un coût de fabrication très réduit par rapport aux composés de l'art antérieur.

Le Fluor-18 (^{18}F) est un émetteur de positons qui permet une détection au moyen des peptides marqués de la présente invention de lipides chargés négativement dans toute zone du corps par des caméras à positons

5 (PET). Ce couplage des peptides de la présente invention, au ^{18}F , permet par exemple de détecter avec une résolution meilleure que le millimètre, la présence de cellules présentant la phosphatidylsérine (PS), présente à la surface externe des cellules impliquées
10 dans des processus physiopathologiques comme la mort cellulaire programmée, l'apoptose, la coagulation du sang, la réaction inflammatoire *in vivo* chez tout être vivant. Elle permet également une telle détection *in vitro* dans des tests de laboratoire.

15 Ces peptides marqués de la présente invention permettent aussi de quantifier de manière précise par exemple le nombre de cellules présentant la phosphatidyle sérine.

20 Les peptides de la présente invention se caractérisent en ce qu'ils comprennent la séquence peptidique (PI) suivante :

25 $\text{J}^1\text{-J}^2\text{-J}^3\text{-J}^4\text{-J}^5\text{-J}^6\text{-Z}^7\text{-U}^8\text{-J}^9\text{-J}^{10}\text{-U}^{11}\text{-Arg-J}^{13}\text{-J}^{14}\text{-U}^{15}\text{-Lys-}$
 $\text{Gly-X}^{18}\text{-Gly-Thr-J}^{21}\text{-Glu-J}^{23}\text{-J}^{24}\text{-U}^{25}\text{-J}^{26}\text{-J}^{27}\text{-J}^{28}\text{-U}^{29}\text{-J}^{30}\text{-J}^{31}\text{-}$
 $\text{Arg-J}^{33}\text{-J}^{34}\text{-J}^{35}\text{-J}^{36}\text{-B}^{37}\text{-J}^{38}\text{-J}^{39}\text{-U}^{40}\text{-J}^{41}\text{-J}^{42}\text{-J}^{43}\text{-U}^{44}\text{-J}^{45}\text{-J}^{46}\text{-J}^{47}\text{-}$
 $\text{J}^{48}\text{-J}^{49}\text{-Arg-J}^{51}\text{-U}^{52}\text{-J}^{53}\text{-J}^{54}\text{-Asp-U}^{56}\text{-Lys-Ser-Z}^{59}\text{-Leu-J}^{61}\text{-J}^{62}\text{-}$
 $\text{J}^{63}\text{-J}^{64}\text{-Z}^{65}\text{-J}^{66}\text{-J}^{67}\text{-U}^{68}\text{-J}^{69}\text{-J}^{70}\text{-J}^{71}\text{-U}^{72}\text{-J}^{73}\text{-J}^{74}\text{-J}^{75}$ (PI)

30 dans laquelle J, Z, U, X et B représentent des acides aminés tels que :

- les acides aminés J sont choisis indépendamment les uns des autres parmi les acides aminés naturels, ou

des dérivés de ceux-ci, de telle manière qu'au moins 50% d'entre eux sont des résidus polaires choisis parmi Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Lys, Orn, Pro, Ser, Thr et Tyr,

5 - les acides aminés U sont choisis parmi Ala, Cys, Gly, Ile, Leu, Met, Phe, Trp, Tyr et Val,

 - l'acide aminé X^{18} est choisi indépendamment des autres acides aminés de la séquence parmi Ala, Asn, Cys, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Met, Phe, Ser, Thr, Trp,
10 Tyr et Val,

 - l'acide aminé B^{37} est choisi indépendamment des autres acides aminés de la séquence parmi Arg, Ala, Cys, Gly, Ile, Leu, Met, Phe, Trp, Tyr et Val,

 - l'acide aminé Z^7 est choisi indépendamment des
15 autres acides aminés de la séquence parmi Asp et Glu,

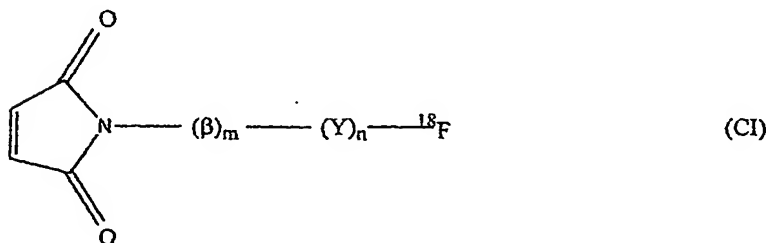
 - les acides aminés Z^{59} et Z^{65} sont choisis indépendamment parmi Glu, Asp, Lys et Arg,

les exposants des J, Z, U, X et B représentant la position de ces acides aminés dans ladite séquence.

20

Selon l'invention, ces peptides de la présente invention, tels qu'ils sont définis ci-dessus, sont marqués directement ou indirectement avec un composé de marquage de la présente invention de formule générale

25 (CI) suivante :



dans laquelle :

- γ , V et W représentent chacun

indépendamment $-NR_{-1}$, $-O-$, $-S-$, $\overset{O}{\parallel}N-$, éthyne, $-CR_1=CR_2-$, $-(C=O)-$, $-(C=S)-$, $-C(=NR_1)-$, $-C(=O)O-$, $-(C=S)S-$, $-C(=NR_1)NR_2-$, $-CR_1R_2-$, $-CR_1OR_2-$, $-CR_1NR_2R_3-$,
 5 où R_1 , R_2 , R_3 et R_4 sont chacun indépendamment choisis parmi l'hydrogène, les halogènes, les groupes phényle, alkyle en C_{1-6} , alcoxy en C_{1-6} , aryloxy, amino, mono- ou di(alkyle en C_{1-6})amino, mono- ou di(aryl)amino, thio, alkyle en C_{1-6} -thio, arylthio, formyle, alkyle en C_{1-6} -carbonyle, arylcarbonyle, carbonyle alcoxy en C_{1-6} -carbonyle, aryloxy-carbonyle, alkyle en C_{1-6} -aminocarbonyle, arylaminocarbonyle, trifluorométhyle.

Généralement, dans la présente description,
 15 halogène signifie fluor, chlore, brome ou iode. C_{1-6} alkyle correspond aux radicaux hydrocarbonés saturés à chaînes linéaires et ramifiées ayant de 1 à 6 atomes de carbone, tels que méthyle, éthyle, propyle, butyle, pentyle et hexyle.

20 Le rattachement et la substitution des hétérocycles, groupe aryle, etc., peut se faire en une position quelconque.

De même, le rattachement du ^{18}F sur γ ou β peut se faire en une position quelconque, en particulier sur
 25 une position quelconque sur un hétérocycle.

Les composés selon l'invention se distinguent fondamentalement des composés de l'art antérieur, du fait de leur structure spécifique dans laquelle la partie portant l'atome de fluor-18 est
 30 constituée, selon l'invention, par un groupe γ spécifique qui est notamment un groupe pyridinyle ; la partie de liaison, de couplage au peptide, est

constituée, selon l'invention par une fonction spécifique, à savoir une fonction maléimido ; et, enfin, la partie de liaison au peptide et la partie portant l'atome de fluor-18 sont reliées selon

5 l'invention par une chaîne ou bras espaceur également spécifique, par exemple de type alkyle (généralement de 2 à 6C), éther d'alkyle, éthers de phénylalkyle, alcényle, qui ne sont pas fragiles et ne sont pas susceptibles de ruptures « in vivo ».

10

Par marquage direct, on entend un couplage directe, sans intermédiaire, tel qu'un bras espaceur, du composé de marquage (CI) avec le peptide de la présente invention, par exemple grâce à une fonction
15 -SH libre du peptide défini ci-dessus, il peut s'agir notamment de la fonction thiol d'une cystéine du peptide.

Ce couplage du composé de marquage (CI) avec le peptide peut se faire soit sur la séquence (PI) définie
20 ci-dessus, par exemple au niveau de résidus cystéines localisés à la surface de la protéine, mais de façon non gênante pour les fonctions de liaison du calcium et des phospholipides, soit sur une partie du peptide autre que celle de ladite séquence (PI). Le couplage se
25 fait par la fonction maléimide du composé (CI).

Plus précisément, ledit couplage est réalisé par réaction de la double liaison du groupe maléimido du composé selon l'invention avec
spécifiquement une fonction -SH(thiol) d'une cystéine
30 faisant partie du peptide.

C'est là un des avantages liés à la structure spécifique des composés selon l'invention que de permettre un marquage spécifique, voire exclusif,

des cystéines, alors que la plupart des autres « synthons » ne permettent qu'un marquage non-spécifique des lysines et des cystéines.

Le marquage sélectif, voire exclusif, des cystéines et dû à la présence dans la molécule de marquage de l'invention d'une fonction « dédiée », à savoir la fonction maléimido, qui est une fonction dédiée pour la chemio-sélectivité envers les thiols des cystéines.

Par marquage indirect, on entend l'utilisation d'un bras espaceur lié d'une part au composé de marquage, et d'autre part au peptide tel qu'il est défini ci-dessus. Ce bras espaceur peut avoir pour fonction d'éloigner le marqueur du peptide afin qu'aucune gêne stérique n'empêche le peptide de reconnaître sa cible (lipide chargé négativement). Ce bras espaceur peut être de nature organique, par exemple un alkyle muni d'un groupe thiol, ou une séquence peptidique comprenant une cystéine par exemple - (Gly)_n-Cys où n est égal ou supérieur à 1.

Il est évident que le couplage du composé de marquage avec le peptide conformément à la présente invention sera en tout état de cause tel qu'il n'inhibe pas ou de manière peu gênante l'activité de reconnaissance spécifique des lipides chargés négativement par le peptide de la présente invention.

La séquence peptidique (PI) ci-dessus se replie dans l'espace pour adopter sa conformation tertiaire qui est la forme active du peptide.

Les acides aminés 12, 15, 16, 17, 19, 20, 22, 50, 55, 57, 58, 59, 60 et 65 du peptide (PI) de la présente invention sont des acides aminés, ou résidus, impliqués directement ou indirectement dans la liaison aux

lipides, c'est à dire qu'il sont impliqués soit dans la structure tridimensionnelle du peptide pour qu'il adopte sa conformation active de reconnaissance, soit dans le site de reconnaissance du lipide.

5 Les acides aminés J sont les acides aminés, ou résidus, de surface de ce peptide lorsqu'il est dans sa conformation repliée et active. Ces résidus sont disposés dans l'espace de telle sorte qu'ils sont partiellement ou totalement exposés au solvant. Selon
10 la présente invention, ces acides aminés J peuvent être par exemple choisis indépendamment les uns des autres parmi l'ensemble des résidus aminoacides naturels Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Orn, Phe, Pro, Ser, Thr Trp, Tyr et Val, et de
15 telle manière que au moins 50% d'entre eux sont des résidus polaires choisis parmi Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Lys, Orn, Pro, Ser et Thr. Des exemples sont donnés dans la liste de séquences annexée.

Les acides aminés U sont les résidus de cœur de
20 ce peptide. Dans la conformation repliée et active du peptide, ils sont disposés dans l'espace proches les uns des autres et non exposés au solvant. Ils constituent le cœur hydrophobe de la protéine. L'assemblage compact des atomes de ces résidus joue un
25 rôle prédominant pour la stabilité du peptide dans sa conformation active. Ces résidus peuvent être choisis dans la liste d'acides aminés U décrite ci-dessus. Différents exemples de combinaisons de résidus de cœur dans le peptide de séquence (PI) de la présente
30 invention sont donnés dans le tableau (1) ci-dessous :

Tableau 1

	U ⁸	U ¹¹	U ¹⁵	U ²⁵	U ²⁹	B ³⁷	U ⁴⁰	U ⁴⁴	U ⁵²	U ⁵⁶	U ⁶⁸	U ⁷²
Ex a)	Val	Leu	Met	Ile	Leu	Arg	Ile	Tyr	Leu	Leu	Val	Leu
Ex b)	Ala	Ile	Ile	Ile	Leu	Arg	Ile	Tyr	Leu	Leu	Ile	Leu
Ex c)	Ala	Ile	Ile	Ile	Leu	Arg	Ile	Tyr	Leu	Leu	Met	Val
Ex d)	Ala	Leu	Met	Leu	Leu	Arg	Ile	Tyr	Leu	Leu	Ile	Met
Ex e)	Ala	Leu	Met	Ile	Ile	Arg	Val	Tyr	Leu	Leu	Ile	Met
Ex f)	Ala	Leu	Met	Ile	Ile	Arg	Ile	Phe	Leu	Leu	Ile	Met
Ex g)	Ala	Leu	Met	Ile	Val	Arg	Ile	Phe	Leu	Leu	Ile	Phe
Ex h)	Val	Leu	Met	Ile	Leu	Arg	Ile	Phe	Leu	Leu	Ile	Met
Ex i)	Ala	Leu	Met	Ile	Leu	Arg	Ile	Phe	Leu	Leu	Ile	Met
Ex j)	Ala	Leu	Met	Ile	Leu	Arg	Ile	Tyr	Leu	Leu	Ala	Ala
Ex k)	Val	Leu	Met	Ile	Leu	Arg	Ile	Tyr	Leu	Leu	Val	Leu
Ex l)	Val	Leu	Met	Ile	Leu	Arg	Ile	Phe	Leu	Leu	Val	Leu

(Ex = exemple)

5

Le résidu X¹⁸ a pour fonction de maintenir la structure de la boucle Gly-X-Gly dans la forme active du peptide, notamment où les résidus Z⁵⁹ et Z⁶⁵ sont des Glu, de moduler le caractère hydrophobe et lipophile de cette boucle, et d'assurer éventuellement des interactions nouvelles spécifiques avec les

10

phospholipides. Ceci est le cas par exemple des résidus Asn, Cys, Ser, Thr, Trp et Tyr.

Les résidus Z⁵⁹ et Z⁶⁵ peuvent être avantageusement des résidus lysine, ce qui a pour effet

5 de remplacer l'ion calcium par le groupe chargé positivement -NH₃⁺ de la lysine et d'améliorer l'affinité du peptide pour une membrane chargée négativement.

10 Le peptide (PI) de la présente invention, dans sa forme active comprend trois sites de liaison à un ion calcium où l'ion calcium complexé par ce site constitue un des ligands d'un phospholipide chargé négativement. Le premier de ces sites, appelé site principal, fait intervenir les résidus 15, 18, 19 et 59 en tant que
15 ligands du calcium. Le deuxième de ces sites, appelé site secondaire, fait intervenir les résidus 20 et 22 en tant que ligands du calcium. Le troisième de ces sites, qui est un site secondaire de faible affinité, fait intervenir les résidus 57, 60, et 65 en tant que
20 ligands du calcium.

Les résidus globalement impliqués dans la liaison aux phospholipides sont les résidus 12, 15, 16, 19, 20, 22, 50, 55, 57, 58, 59, 60 et 65. Cette liste inclut des résidus impliqués dans les liaisons du calcium, les
25 phospholipides étant des ligands du calcium.

Ces résidus peuvent bien entendu être remplacés par des résidus remplissant la même fonction en vue du même résultat conformément à la présente invention.

A titre d'exemple, selon l'invention, le peptide
30 de formule (PI) peut être avantageusement une séquence peptidique choisie parmi les séquences peptidique ID n°1 à ID n°10 annexées.

La séquence (PI) représente les peptides de la présente invention dans leur forme fonctionnelle la plus courte. Il est bien entendu que cette séquence peut comprendre en outre, lié à l'extrémité N-terminale et/ou à l'extrémité C-terminale de la séquence (PI), un ou plusieurs acides aminés, par exemple de 1 à 15 acides aminés, en général de 1 à 10 acides aminés. De toute préférence, ces acides aminés complémentaires ne modifient pas ou peu l'activité des peptides, ou alors l'améliorent.

Par exemple, une petite séquence, appelée ci-dessous séquence de fonctionnalisation peut être utile notamment pour fixer un marqueur sur le peptide, pour fixer une molécule de traitement de maladies sur le peptide et/ou pour fixer ledit peptide sur un support. La longueur de cette séquence de fonctionnalisation sera adaptée suivant son usage. Bien entendu, celle-ci n'interférera de préférence pas avec l'activité du peptide de la présente invention. L'homme du métier saura facilement adapter la longueur et la nature de cette séquence de fonctionnalisation suivant l'utilisation qu'il fera d'un peptide de la présente invention.

Ainsi, selon un premier mode particulier de réalisation de la présente invention, les peptides de la présente invention peuvent comporter, par exemple à leur extrémité N-terminale, une séquence de fonctionnalisation de trois acides aminés. Cette séquence de fonctionnalisation permet une fixation directe du composé de marquage (CI) sur le peptide. Les peptides conformes à ce mode de réalisation peuvent être définis par la séquence (PII) suivante :

$J^{-2}-J^{-1}-J^0-J^1-J^2-J^3-J^4-J^5-J^6-Z^7-U^8-J^9-J^{10}-U^{11}-Arg-J^{13}-J^{14}-U^{15}-$
 $Lys-Gly-X^{18}-Gly-Thr-J^{21}-Glu-J^{23}-J^{24}-U^{25}-J^{26}-J^{27}-J^{28}-U^{29}-J^{30}-$
 $J^{31}-Arg-J^{33}-J^{34}-J^{35}-J^{36}-B^{37}-J^{38}-J^{39}-U^{40}-J^{41}-J^{42}-J^{43}-U^{44}-J^{45}-J^{46}-$
 $J^{47}-J^{48}-J^{49}-Arg-J^{51}-U^{52}-J^{53}-J^{54}-Asp-U^{56}-Lys-Ser-Z^{59}-Leu-J^{61}-$

5 $J^{62}-J^{63}-J^{64}-Z^{65}-J^{66}-J^{67}-U^{68}-J^{69}-J^{70}-J^{71}-U^{72}-J^{73}-J^{74}-J^{75}$ (PII)

dans laquelle J, Z, U, X et B sont tels que définis ci-dessus.

Par exemple, J^{-2} peut être Gly, J^{-1} peut être Ser,
 10 ou Cys et J^0 peut être Cys, Thr, Pro, Ser, ou Gln, de
 préférence J^0 est Cys. Cette séquence $J^{-2}J^{-1}-J^0$ peut
 être choisie par exemple parmi Gly-Ser-Cys-, et Gly-
 Cys-Ser-. Ainsi, par exemple, chacune des séquences
 IDn°1 à IDn°10 précitée peut comporter au choix chacune
 15 des séquences fonctionnelles précitées. La séquence
 IDn°12 de la liste de séquences annexée n'est qu'un
 exemple non limitatif d'une séquences (PII) selon la
 présente invention comportant à son extrémité N-
 terminale une séquence fonctionnelle de trois acides
 20 aminés.

Selon un deuxième mode particulier de réalisation
 de la présente invention, les peptides de séquence (PI)
 peuvent comporter, par exemple à leur extrémité N-
 terminale, une séquence de fonctionnalisation de quatre
 25 acides aminés $J^{-3}-J^{-2}J^{-1}-J^0$ choisie parmi Gly-Ser-Gly-
 Cys-, Gly-Cys-Gly-Ser, et Gly-Cys-Gly-Cys. Cette
 séquence de fonctionnalisation est utile par exemple
 pour une fixation directe du composé de marquage (CI)
 sur le peptide. Ainsi, par exemple, chacune des
 30 séquences IDn°1 à IDn°10 précitées peut comporter au
 choix chacune des séquences fonctionnelles précitées.
 Les séquences IDn°11 de la liste de séquences annexée
 (plusieurs séquences sont regroupées en une seule sous

la dénomination IDn°11) ne sont que des exemples non limitatifs de séquences (PI) selon la présente invention comportant à son extrémité N-terminale une séquence fonctionnelle de quatre acides aminés.

5 Selon un troisième mode particulier de réalisation de la présente invention, les peptides de séquence (PI) peuvent comporter, par exemple à leur extrémité N-terminale, une séquence de fonctionnalisation de sept à onze acides aminés. Cette
10 séquence de fonctionnalisation est également utile pour fixer directement le composé (CI) sur le peptide. Ce mode de réalisation est exposé ci-dessous. Ainsi, par exemple, chacune des séquences IDn°1 à IDn°10 précitées peut comporter au choix chacune des séquences
15 fonctionnelles précitées. On peut aussi remplacer la séquence Gly-Ser-Gly-Cys des séquences IDn°11 à 14 par Gly-Bb1-Gly-Bb2, dans laquelle Bb1 et Bb2 sont indépendamment Cys ou Ser. Les séquences IDn°13 et 14 de la liste de séquences annexée (plusieurs séquences
20 sont regroupées en une seule sous la dénomination IDn°13 ou 14) ne sont que des exemples non limitatifs de tels peptides.

Les peptides de la présente invention ont une
25 affinité suffisante pour le calcium et sont capables de se lier de manière réversible à des effecteurs lipidiques, et notamment à ceux chargés négativement, tel que les phosphatidylsérines, les acides phosphatidiques, les phosphatidyléthanolamines, les
30 phosphatidylglycérols, les cardiolipines et les phosphatidylinositolphosphates.

Il s'agit d'une famille de peptides dont la propriété principale est de reconnaître spécifiquement

l'apparition des signaux lipidiques à la surface des membranes cellulaires en relation avec le fonctionnement normal ou pathologique des tissus.

5 Les peptides de la présente invention peuvent être synthétisés par les procédés classiques de synthèse de la chimie organique ou de la chimie des protéines, ainsi que par recombinaison génétique *in vivo* ou *in vitro*, par génie génétique, etc.

10 Le peptide selon l'invention peut être synthétisé par synthèse chimique en phase solide dudit peptide. Cette synthèse chimique peut être réalisée par exemple avec un synthétiseur automatique de peptide du type Applied Biosystems, mod.433A. Elle peut être réalisée
15 par exemple en chimie Fmoc qui utilise le groupement fluoremylméthyloxycarbone pour la protection temporaire de la fonction α -aminique des acides aminés.

Les éléments techniques pour la réalisation de ce procédé de synthèse peptidique sont connus de l'homme
20 du métier. Ils sont décrits par exemple dans l'ouvrage Solid-Phase Organic Synthesis de Kevin Burgess (Editor) Wiley-Interscience; ISBN: 0471318256; (February 2000).

Le peptide de l'invention peut aussi être
25 fabriqué par recombinaison génétique *in vivo* par exemple au moyen d'un procédé comprenant les étapes suivantes :

- a) préparation d'un cDNA comprenant une séquence de base codant pour ledit peptide
- 30 b) insertion dudit cDNA dans un vecteur d'expression approprié,
- c) transformation d'une cellule hôte appropriée, avec ledit vecteur dans lequel le cDNA a été

inséré, pour une répllication du plasmide,
d) fabrication dudit peptide par traduction
dudit cDNA dans ladite cellule hôte, et
e) récupération du peptide synthétisé.

5

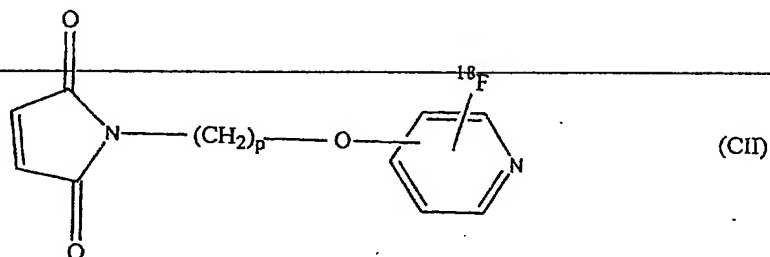
Selon l'invention, le vecteur d'expression approprié et la cellule hôte sont choisis selon les techniques habituelles pour la recombinaison génétique. Le vecteur peut être l'un quelconque des plasmides
10 généralement utilisés dans cette technique, par exemple un plasmide tel que le vecteur pGEX-2T. De même la cellule peut être choisie selon les techniques habituelles, il peut s'agir par exemple de *E. Coli*.

Lorsqu'une technique de recombinaison génétique
15 *in vitro* est utilisée, les étapes c) et d) du procédé ci-dessus sont remplacées respectivement par les étapes c') d'introduction du vecteur dans lequel le cDNA a été inséré dans un milieu réactionnel adéquat pour une répllication du plasmide, et d') de fabrication dudit
20 peptide par traduction dudit cDNA dans ledit milieu réactionnel adéquat. Le document Jagus, R. and Beckler, G.S. (1998) Overview of eukaryotic *in vitro* translation and expression systems, *Current Protocols in Cell Biology* 11.1.1-11.1.13., 1998 by John Wiley & Sons,
25 Inc. décrit des procédés *in vitro* utilisables dans la présente invention.

Selon l'invention, avantageusement dans le composé (CI) de marquage ci-dessus, $n=1$, et Y est un
30 groupe 3-pyridinyle.

Les composés de formule (CI) peuvent appartenir à diverses familles, une première famille

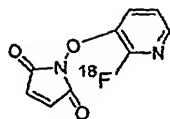
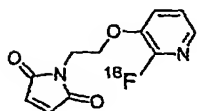
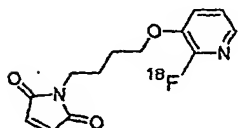
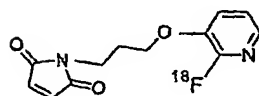
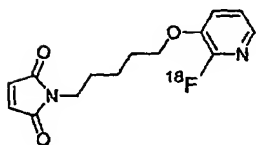
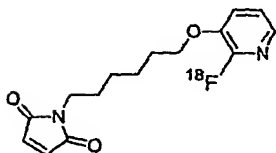
peut être définie comme celle des « éthers d'alkyle », qui répondent à la formule (CII) suivante :



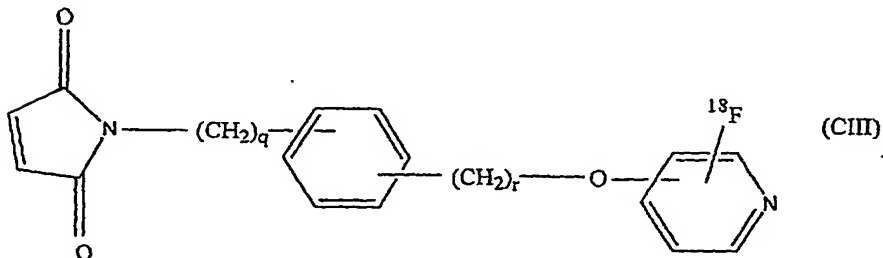
5

dans laquelle p est un nombre entier de 1 à 10, tel que 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou 9.

Les composés préférés de formule (CII) sont
10 choisis parmi les composés suivants :

1-[(2-[¹⁸F]fluoro-pyridin-3-yloxy)-methyl]-pyrrole-2,5-dione1-[2-(2-[¹⁸F]fluoro-pyridin-3-yloxy)-ethyl]-pyrrole-2,5-dione1-[4-(2-[¹⁸F]fluoro-pyridin-3-yloxy)-butyl]-pyrrole-2,5-dione1-[3-(2-[¹⁸F]fluoro-pyridin-3-yloxy)-propyl]-pyrrole-2,5-dione1-[5-(2-[¹⁸F]fluoro-pyridin-3-yloxy)-pentyl]-pyrrole-2,5-dione1-[6-(2-[¹⁸F]fluoro-pyridin-3-yloxy)-hexyl]-pyrrole-2,5-dione

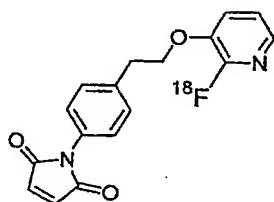
Une deuxième famille de composés de formule
(CI) peut être définie comme celles des « éthers de
5 phénylalkyle », qui répondent à la formule (CIII)
suivante :



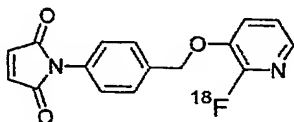
(CIII)

dans laquelle q et r représentent indépendamment un nombre entier de 0 à 10, tels que 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9.

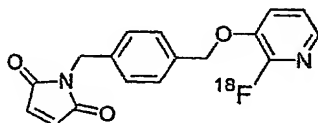
Les composés préférés de formule (CIII) sont
5 choisis parmi les composés suivants :



1-(4-[2-(2-[¹⁸F]Fluoro-pyridin-3-yloxy)-ethyl]-phenyl)-pyrrole-2,5-dione

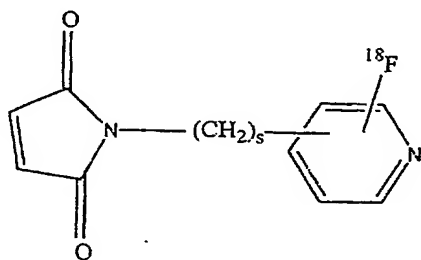


1-[4-(2-[¹⁸F]Fluoro-pyridin-3-yloxymethyl)-phenyl]-pyrrole-2,5-dione



1-[4-(2-[¹⁸F]Fluoro-pyridin-3-yloxymethyl)-benzyl]-pyrrole-2,5-dione

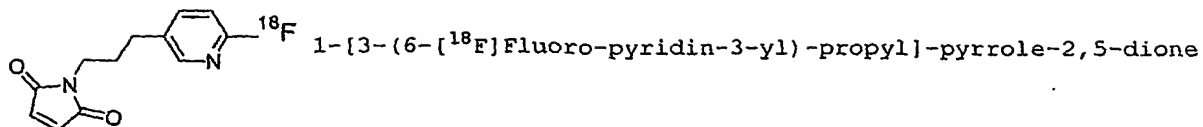
Une troisième famille est celle des composés qui
10 répondent à la formule (CIV) suivante :



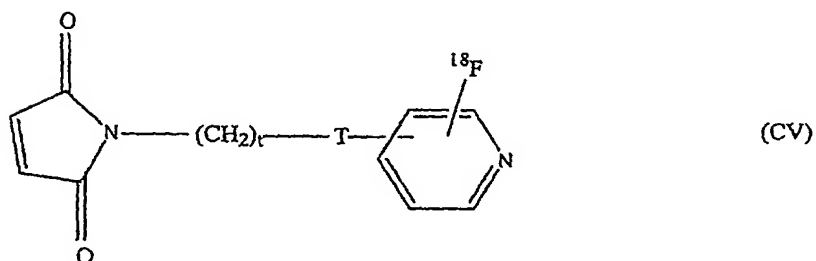
(CIV)

dans laquelle s est un nombre entier de 1 à 10, tel que
15 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9.

Un composé préféré de formule (CIV) est le composé suivant :

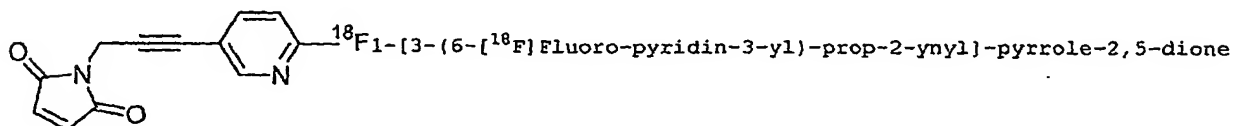
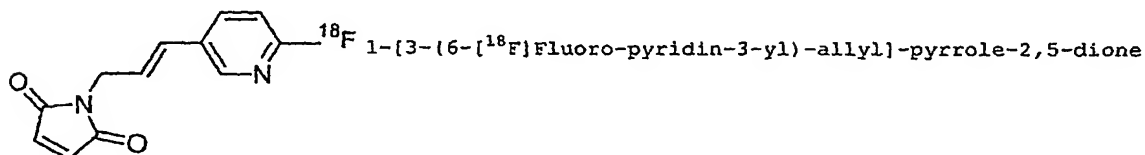


Une quatrième famille est celle des composés qui
5 répondent à la formule (CV) suivante :



dans laquelle t est un nombre entier de 0 à 10, tel que
10 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 et T est un groupe -CH=CH- ou
-C≡C-.

Des composés préférés de formule (CV) sont
les composés suivants :

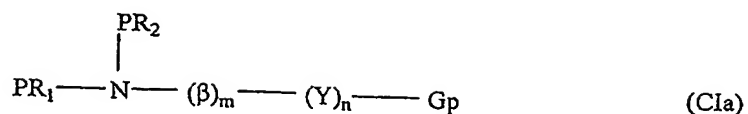


15

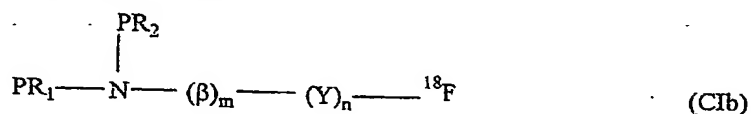
Le composé (CI) de marquage peut être
préparé par un procédé dans lequel :

a) on met en contact un composé précurseur
de formule (CIa) :

20

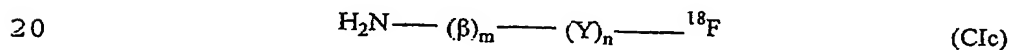


dans laquelle PR_1 et PR_2 représentent indépendamment un atome d'hydrogène ou un groupe protecteur de la fonction amine, à la condition que PR_1 et PR_2 ne soit pas tous deux (simultanément) un atome d'hydrogène, ou bien PR_1 et PR_2 forment ensemble avec l'atome d'azote un groupe protecteur cyclique de la fonction amine, Gp représente un groupe partant susceptible d'être remplacé par un atome de fluor-18, et β , Y , m et n ont la signification déjà donnée plus haut ; avec une source d'ions fluorure F^- marqués au ^{18}F , pour donner un composé de formule (CIb) :



15

b) on élimine dans le composé (Ib), le ou les groupe(s) protecteur(s) PR_1 et/ou PR_2 de la fonction amine pour donner un composé de formule (Ic) :



20

c) on fait réagir le composé (CIc) avec un réactif susceptible de donner un groupe maléimido à partir d'un groupe amino, pour obtenir le composé final de formule (CI).

25

Le procédé selon l'invention est simple, fiable, facile à mettre en œuvre et peut être aisément robotisé. Il comporte seulement trois étapes dont l'une est une étape extrêmement simple de déprotection.

La durée globale du procédé est faible : à titre d'exemple, elle est généralement de 60 à 120 minutes, de préférence de 75 à 85 minutes.

5 L'incorporation de l'halogène fluor-18 est réalisée de manière extrêmement efficace avec un fort rendement, par exemple 70 à 100 %, du fait, en particulier, qu'il est effectué sur un groupement hétérocyclique, tel que la pyridine.

10 Le rendement final de l'ensemble du procédé pour un produit purifié est extrêmement élevé, par exemple de 15 % à 25 % et les quantités potentielles de composé « synthon », en fin de synthèse, sont également très importantes

15 Dans le composé (CIa), les groupes PR_1 et PR_2 lorsqu'ils sont des groupes protecteurs peuvent être tout groupe protecteur connu en chimie organique. Ils sont choisis, de préférence, parmi les groupes TertioButoxyCarbonyle (BOC) et FluorénylMéthOxyCarbonyle (FMOC).

20 Lorsque PR_1 et PR_2 forment ensemble avec l'atome d'azote de la fonction amine, un groupe protecteur de celle-ci, ce groupe protecteur peut être, par exemple, un groupe phtalimido.

25 Dans le composé (CIa), le groupe Gp peut être tout groupe partant susceptible d'être remplacé par un atome de fluor-18 ; Gp est choisi, de préférence, parmi les halogènes, tels que F, Cl, Br, I, les groupes mésyle, tosylo et triflate, lorsque Y est un groupe alkyle ; et Gp est choisi, de préférence, 30 parmi les halogènes, les sels d'ammonium, tel que le triméthylammonium-trifluorométhane sulfonate, et le groupe nitro, lorsque Y est un groupe aromatique ou hétérocyclique.

Dans l'étape a), la source d'ions fluorure marqués au ^{18}F comprend lesdits ions fluorure et un contre-ion, choisi parmi les cations de grande taille, tels que le rubidium, et le tétrabutylammonium, et les

5 cations de petite taille, tels que le potassium, le sodium et le lithium, lesdits cations de petite taille étant piégés, stabilisés, par exemple, par un cryptand ou un éther couronne, etc., ledit cryptand ou éther couronne étant adapté au cation de petite taille mis en
10 œuvre.

Un exemple de cryptand est le produit KRYPTOFIX[®] K₂₂₂ : (4, 7, 13, 16, 21, 24-hexaoxa-1,10-diazabicyclo[8.8.8]hexacosane) qui piège, par exemple, l'ion potassium.

15 Le contre-ion ou cation peut être amené sous la forme d'un sel quelconque, par exemple, il peut s'agir de K₂CO₃, dans le cas du potassium.

L'étape a) est généralement réalisée dans un solvant, qui peut être tout solvant adéquat, tel que
20 le DMSO.

L'étape a) peut être réalisée dans des conditions connues de l'homme du métier, avec un chauffage généralement à une température de 50 à 200°C, par exemple, 145°C, pendant une durée généralement de 1
25 à 30 minutes, par exemple de 4 à 6 minutes.

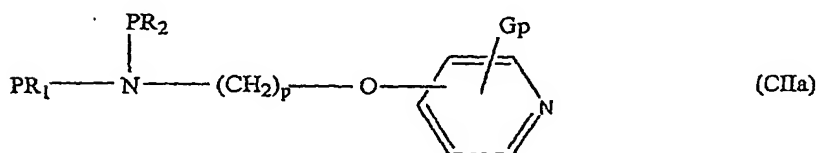
L'étape b) d'élimination du groupe protecteur de la fonction amine, de déprotection, pour donner le composé de formule (CIc), où le groupe amino est libre, peut être réalisée par tout procédé de
30 déprotection connu. On pourra, par exemple, mettre le composé (CIb) en contact avec du TFA dans le CH₂Cl₂ pendant une durée généralement de 1 à 5, par exemple de 2 minutes.

Il est à noter que le TFA est utilisé généralement, uniquement si le groupe récepteur est enlevé en milieu acide, par exemple lorsque $PR_1 = BOC$ et $PR_2 = H$.

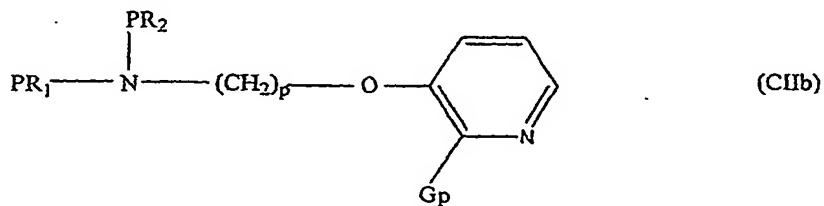
Dans l'étape c), le réactif susceptible de donner un groupe maléimido à partir d'un groupe amido peut être tout composé connu. Il pourra ainsi être choisi parmi la N-méthoxycarbonylmaléimide et la succinimide.

L'étape c) peut être réalisée dans des conditions connues de l'homme du métier, par exemple dans un solvant, tel que le xylène, le THF, avec un chauffage généralement à une température de 100 à 200°C, par exemple de 190°C, pendant une durée de 1 à 20 minutes, par exemple de 5 minutes.

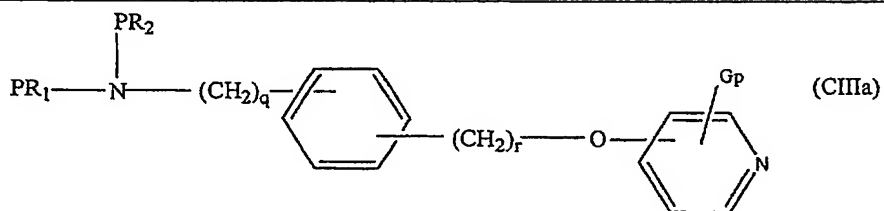
Le composé de formule (CIa) peut répondre à la formule (CIIa) suivante :



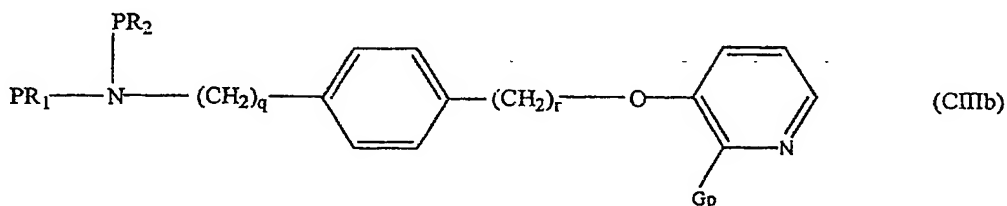
Le composé (CIIa) répond, de préférence, à la formule (CIIb) suivante :



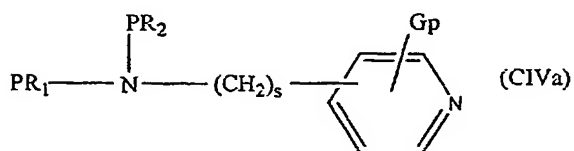
Le composé de formule (CIa) peut, dans un autre mode de réalisation, répondre à la formule (CIIIa) suivante :



Le composé (CIIIa) répond, de préférence, à la formule (CIIIfb) suivante :



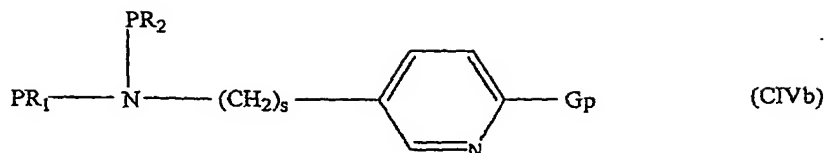
Le composé de formule (CIa) peut, dans encore un autre mode de réalisation, répondre à la formule (CIVa) suivante :



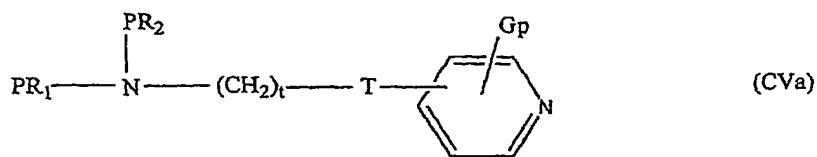
Le composé (CIVa) répond, de préférence, à la formule (CIVb) suivante :

20

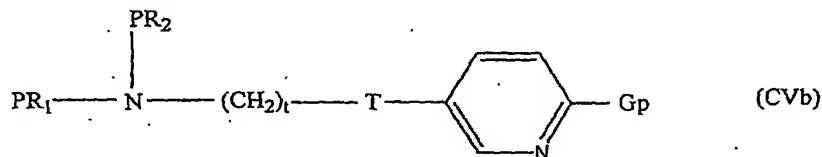
34



Dans un autre mode de réalisation, le composé de formule (CIa) peut répondre à la formule (CVa) suivante :



Le composé (CVa) répond, de préférence, à la formule (CVb) suivante :



La présente invention se rapporte également à un procédé de synthèse du peptide marqué par le Fluor-18 conforme à la présente invention. Ce procédé de synthèse comprend une étape d'addition d'un composé (CI) défini ci-dessus avec un peptide comprenant la séquence (PI) définie ci-dessus. Il s'agit en effet d'une réaction d'addition réalisée entre la double liaison de la fonction maléimide du composé (CI) et une fonction -SH libre du peptide, notamment la fonction thiol d'une cystéine, du peptide comprenant la séquence peptidique (PI). L'addition peut être effectuée directement sur une fonction -SH libre de la séquence peptidique (PI), notamment sur la fonction thiol d'une cystéine de la séquence peptidique, comme décrit ci-

dessus. Cette addition peut être faite par exemple dans un solvant acétonitrile/méthanol en proportion respectivement 2:1 en volumes ou dans tout autre solvant approprié pour ce type de réaction d'addition.

5 ~~Il sera bien entendu nécessaire de veiller à ce que le~~
solvant utilisé n'affecte pas le peptide (PI) de l'invention.

Ce procédé présente donc l'avantage d'être facile à mettre en œuvre contrairement aux procédés de
10 marquage de l'art antérieur.

Le couplage se fera en préservant l'activité du peptide de la présente invention, et en général aux extrémités ou au niveau des extrémités du peptide de la présente invention, sur des résidus de surface, ou sur
15 une partie de la séquence peptidique différente de la séquence (PI) définie ci-dessus et notamment sur la séquence (PII).

La présente invention fournit également un
20 assemblage marqué ayant une affinité pour un phospholipide, comprenant au moins deux peptides comprenant la séquence (PI) définie ci-dessus, identiques ou différents, lesdits peptides étant liés entre eux, et chacun ou l'un seulement de ces peptides
25 étant marqué au moyen d'un composé de marquage (CI) selon l'invention. Ces assemblages peuvent être réalisés par exemple par insertion d'un lien peptidique flexible, par exemple poly-glycine, entre le résidu C-terminal d'un peptide de l'invention et le résidu N-
30 terminal du second peptide et ainsi de suite selon le nombre de peptides mis bout à bout. Ce lien poly-glycine peut être de formule $-(Gly)_n-$, n étant un

nombre entier allant de 1 à 12, par exemple supérieur à 4.

5 Ces assemblages peuvent également être synthétisés par les procédés classiques de synthèse de la chimie organique ou de la chimie des protéines, ainsi que par recombinaison génétique *in vivo* ou *in vitro*, par génie génétique, etc., par exemple par un des procédés précités.

10 Ces assemblages ont notamment pour but d'augmenter l'affinité des peptides de la présente invention pour le phospholipide, par exemple pour un phospholipide chargé négativement.

15 L'utilisation d'un peptide marqué ou d'un assemblage marqué de la présente invention peut se faire dans deux directions qui sont la recherche et le diagnostic, et les applications sont très nombreuses.

20 Les pathologies spécialement visées par la présente invention sont : (i) les troubles de la coagulation sanguine, (ii) les phénomènes d'apoptose consécutifs à l'action de composés chimiques, d'effets physiques comme les radiations ionisantes, d'effets biologiques comme ceux liés à la formation ou la nécrose des tissus cancéreux, outre les phénomènes
25 normaux d'apoptose, (iii) les pathologies inflammatoires, et (iv) les troubles associés aux relations entre les cellules et la matrice extracellulaire et notamment le collagène.

30 Les peptides de la présente invention présentent en outre un avantage important par rapport aux composés de l'art antérieur : la réversibilité de leurs processus de repliement qui permet leur manipulation à des températures élevées mais compatibles avec la

stabilité chimique des peptides, à des fins de modifications chimiques dans le but de développer des molécules utilisables en imagerie.

En outre, en raison de leur faible taille, les
5 ~~peptides de la présente invention~~ peuvent être facilement associés à d'autres protéines soit pour former des protéines chimères multifonctionnelles, soit pour introduire un mécanisme de régulation par des effecteurs autres que les phospholipides de
10 signalisation.

Selon l'invention, les peptides et les assemblages selon l'invention couplés au composé (CI) forment des composés de marquage utilisables par exemple pour un diagnostic *in vivo* ou *in vitro*.

15 En effet, les peptides de la présente invention peuvent être utilisés pour la détection de pathologies impliquant l'apparition de charges négatives à la surface des cellules et la libération dans le sang de microvésicules : par exemple les troubles de la
20 coagulation, les pathologies inflammatoires aiguës, etc. et l'apoptose.

L'halogène radioactif est le Fluor-18 qui est un radioélément à vie courte car il permet une détection "in vivo" de la localisation des zones thrombotiques
25 lors d'accidents vasculaires de toutes sortes, en particulier des foyers apoptotiques et inflammatoires, en utilisant des systèmes d'imagerie appropriés.

Les peptides ou assemblages marqués par le Fluor-18, suivant l'application désirée, peuvent être
30 avantageusement conditionnés sous la forme de trousse de diagnostic. Ainsi, la présente invention fournit également une trousse de diagnostic comprenant un

peptide ou un assemblage marqué conforme à la présente invention.

La présente invention fournit également une trousse d'analyse et de détection de charges négatives
5 à la surface de cellules, caractérisée en ce qu'elle comprend un peptide ou un assemblage marqué de la présente invention.

La présente invention fournit également une trousse d'analyse et de détection de microvésicules
10 dans le sang, caractérisée en ce qu'elle comprend un peptide ou un assemblage marqué conforme à la présente invention.

Les peptides marqués par le Fluor-18 selon l'invention peuvent donc être utiles pour la
15 fabrication d'un produit destiné à la détection de centres exposant des lipides chargés négativement à la surface de cellules et/ou la libération dans le sang de microvésicules. Comme précisé ci-dessus, la détection peut être une détection au moyen d'images
20 scintigraphiques acquises en tomographie par émission de positons, du fait que le composé (CI) comprend du ^{18}F .

Dans leur application, dans le cadre de la « TEP », les composés (CI) et les peptides marqués,
25 selon l'invention, comprenant un atome de fluor-18 montrent de nombreux avantages par rapport aux composés avec un autre halogène radioactif, par exemple l'iode.

En effet, le seul isotope de l'iode émetteur de positons est l'iode-124, qui pourrait
30 permettre la TEP.

Mais, il reste produit à de faibles quantités (qqes mCi contre des curies pour le F-18). Il est aussi difficile à produire. Enfin, l'iode-124 n'est pas un

émetteur de positons pur (le fluor-18, 97 %) et décroît par émission beta+ à 25 % seulement et par capture électronique à 75 % ; il possède un grand nombre de raies gamma allant de 0,603 MeV (62 %) à 2,75 MeV (1 %).

L'invention concerne en outre des compositions pour l'analyse et la détection par exemple par tomographie par émission de positons (TEP), ou des compositions pour le diagnostic comprenant un peptide marqué par le fluor 18 tel que décrit plus haut et un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

D'autres avantages et caractéristiques de la présente invention apparaîtront encore à la lecture des exemples illustratifs et non limitatifs qui suivent, en référence aux figures en annexe.

BREVE DESCRIPTION DE LA LISTE DE SEQUENCES

- Les séquences IDn°1 à IDn°14 annexées sont des exemples de peptides comportant la séquence peptidique (PI) et (PII) de la présente invention.

En, particulier, les séquences IDn°11, IDn° 13 et IDn°14 sont des exemples de peptides comportant la séquence peptidique de la présente invention dans lesquels des mutations ont été introduites pour augmenter l'affinité pour le calcium et les phospholipides.

BREVE DESCRIPTION DES FIGURES

- Les figures 1 et 2 sont des micrographies obtenues à partir de coupes de tissus respectivement d'un cœur apoptotique (figure 1) et d'un rein (figure 2). Ces coupes ont été obtenues d'une part (clichés de

gauche) avec des peptides AFIM-fluorescéine (AFIM-F) de la présente invention, d'autre part (clichés de droite) avec de l'annexine 5 -fluorescéine (A5-F) (composé de l'art antérieur) : microscopie de fluorescence, grossissement x 40. Les clichés du centre ont été obtenus avec de l'hématoxyline : microscope en lumière visible, grossissement x 40. Sur la figure 1, les photos du haut et du bas représentent différentes coupes du cœur.

10 - La figure 3 est un graphique qui représente le taux d'hélicité « H » (en %) d'un peptide selon la présente invention en fonction de la température « t » en °C.

15 EXEMPLES

Exemple 1 : Synthèse par recombinaison génétique : Expression et purification des peptides de séquences ID n°1 à ID n°12 de la présente invention

20 Les séquences ID n°1 à ID n°14 ont été préparées par surexpression dans *E. Coli* selon le même protocole que celui qui a été décrit par F. Cordier-Ochsenbein et al. dans *J. Mol. Biol.* 279, 1177-1185.

Les cDNA de chacune de ces séquences ont été préparés en utilisant une réaction de polymérase en chaîne (PCR). Ils ont été insérés dans le vecteur pGEX-2T (Smith & Johnson, 1998). La figure 2 est un schéma illustrant l'insertion du cDNA dans le vecteur. L'absence de mutations induites par la PCR a été
25 contrôlée par séquençage.
30

La production des peptides est effectuée en utilisant la souche *E. Coli* BL21 contenant le vecteur d'expression décrit plus haut. Après induction par

l'isopropylthiogalactopyranoside (IPTG, 100 μ m) jusqu'à une densité optique de 1 à 600 nm, la pousse est continuée jusqu'à ce qu'un plateau soit atteint, c'est-à-dire pendant environ 3 heures. Après centrifugation,

5 ~~les bactéries sont re-suspendues dans le tampon de lyse~~
comprenant 50 mM Tris-HCl, pH 8, 10 mM EDTA, 500 mM NaCl, 5% (v/v) glycérol, 1% (v/v) Triton X100, 1 mM dithiothréitol (DTT), 1 mM fluorure de phénylméthylsulfonyl (PMSF) et 20 μ g/ml d'aprotinine.

10 La purification a été effectuée de la façon suivante : après sonication et centrifugation à 10000 g, le surnageant contenant les protéines solubles est incubé avec des billes de glutathion/agarose permettant la liaison spécifique à ces billes de la
15 protéine de fusion GST-domaine. Après lavage avec une solution contenant 1 M NaCl, 50 mM Tris-HCl à pH 8, 70 unités de thrombine par litre de culture sont ajoutés et les séquences sont éluées.

Les séquences sont alors purifiées sur une
20 colonne proRPC (marque de commerce) de type 16/10, fournie par la société Pharmacia en utilisant un système FPLC et un gradient linéaire d'eau de qualité Millipore (marque de commerce) contenant 0,1% (v/v) d'acide trifluoroacétique TFA, et d'acétonitrile
25 contenant 0,1% de TFA. La vitesse d'écoulement est ajustée à 2,5 ml/minute. Les séquences sont ensuite lyophilisées.

Le rendement final pour chaque peptide est d'environ 8 mg de séquence par litre de culture.

Exemple 2 : Exemple de synthèse chimique de peptides de la présente invention

Les peptides de la présente invention ont été fabriqués dans cet exemple par synthèse chimique en phase solide avec un synthétiseur automatique de peptides Applied Biosystems, mod. 433A, et en chimie Fmoc, qui utilise le groupement Fluorénylméthoxyloxycarbonyl (Fmoc) pour la protection temporaire de la fonction α -aminique des acides aminés.

Les groupements protecteurs utilisés pour prévenir les réactions secondaires des chaînes latérales des acides aminés, dans cette stratégie Fmoc, ont été le tertio-butyle éther (tBu) pour les résidus Ser, Thr et Tyr ; tertio-butyle ester (OtBu) pour Asp, Glu ; trityle (Trt) pour Gln, Asn, Cys, His ; tertio-butyloxycarbonyl (Boc) pour Lys et 2,2,5,7,8-pentaméthylchromane-6-sulfonyl (Pmc) pour Arg.

La réaction de couplage se déroule avec un excès de 10 équivalents d'acides aminés (1 mmol) par rapport à la résine (0,1mmol). L'acide aminé protégé est dissous dans 1 ml de N-méthylpyrrolidone (NMP) et 1 ml d'une solution de 1-N-hydroxy-7-azabenzotriazole (HOAt) 1M dans le solvant NMP. 1 ml d'une solution de N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) 1M est alors ajouté. Après 40 à 50 minutes d'activation, l'ester actif formé est transféré dans le réacteur qui contient la résine. Avant cette étape de transfert puis de couplage, la résine est déprotégée de son groupement Fmoc par une solution de 20 % de pipéridine dans le NMP. L'excès de pipéridine est enlevé par lavage à la NMP après 5 à 10 minutes environ.

Pendant la déprotection, la détection des adduits dibenzofulvène-pipéridine à 305 nm permet de suivre le bon déroulement de la synthèse. En effet, la quantification de l'adduit permet d'estimer

5 ~~l'efficacité de la déprotection du groupement Fmoc et~~
par suite du couplage du dernier acide aminé incorporé.

Le clivage de la résine et des groupements protecteurs présents sur les chaînes latérales a été réalisé simultanément par traitement du peptide lié à
10 la résine par de l'acide trifluoroacétique (TFA). Avant d'effectuer le clivage, la résine a été lavée plusieurs fois au dichlorométhane (DCM) et enfin séchée. Le réactif utilisé lors du clivage est un mélange acide contenant 81,5 % de TFA et les piègeurs phénol (5 %),
15 eau (5 %), éthanedithiol (2,5% lorsque le peptide comporte une cystéine) et tri-isopropylsilane (1 %). La résine a été traitée avec ce mélange pendant trois heures sous agitation et à température ambiante, à raison de 100 ml de solution par gramme de résine. Le
20 peptide libre en solution a été récupéré par filtration. Le peptide a été ensuite précipité et lavé à froid dans l'éther de diisopropyle puis dissous dans de l'acide acétique à 20 % et lyophilisé.

Le peptide récupéré après lyophilisation, le brut
25 de synthèse, se trouve sous forme réduite, c'est à dire que les ponts disulfures inter-chaînes ne sont pas formés.

Le peptide est alors purifié sur une colonne proRPC (marque de commerce) de type 16/10, fournie par
30 la société Pharmacia en utilisant un système FPLC et un gradient linéaire d'eau de qualité Millipore (marque de commerce) contenant 0,1% en volume d'acide trifluoroacétique TFA, et d'acétonitrile contenant 0,1%

de TFA. La vitesse d'écoulement est ajustée à 2,5 ml/minute. Le peptide est ensuite lyophilisé.

Les produits obtenus ont été analysés par spectrométrie de masse.

5

Exemple 3 : Stabilité des séquences ID n°1 à IDn°14

Cet exemple montre que les peptides de la présente invention constituent des protéines de repliement stables.

10 Composition du blanc (témoin) :

Tris 50 mM, NaCl 150 mM, DTT 1 mM pH8 10 µL

H₂O 990 µL

Ajusté à pH8

Composition de l'échantillon :

15 Echantillon : domaine purifié dans tampon Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH8 Concentration aprox. : 200 mg.ml.

Domaine : 10 µL soit 300 µM final.

H₂O : 990 µL.

pH mesuré à 7,8.

20 Configuration matérielle et logicielle :

Appareil Jobin Yvon CD6.

Logiciel CD-max

Trajet optique de la cuvette de mesure : 1 cm.

25 La figure 1 annexée représente le taux d'hélicité de AFIM en fonction de la température tel qu'il est mesuré à l'aide du signal de dichroïsme circulaire dans l'UV lointain à la longueur d'onde de 220 nm.

30 Sur cette figure, la valeur du signal à 14°C est prise pour le 100% du contenu en hélice du peptide. La dénaturation thermique du peptide est bien coopérative et démontre qu'à basse température et notamment à 37°C il s'agit d'un peptide convenablement replié et présentant une stabilité améliorée.

Exemple 4 : Assemblages de deux peptides de la présente invention

Le procédé décrit dans l'exemple 1 ci-dessus est
 5 utilisé pour synthétiser une séquence peptidique de
 séquence IDn°1-(gly)₄-IDn°1.

Le rendement final pour l'assemblage est
 d'environ 14 mg/litre de culture.

Cet assemblage peut être marqué par un halogène
 10 radioactif selon la présente invention, de la même
 manière que le peptide seul, par exemple par le procédé
 décrit ci-dessous.

Exemple 5 : Synthèse d'un composé de marquage de la
 15 présente invention

Dans cet exemple, on décrit la préparation d'un
 composé de marquage selon l'invention, qui est la
 1- [3- (2- [¹⁸F] fluoro-pyridin-3-yloxy) -propyl] -pyrrole-2,5
 20 -dione.

a) Complexe K[¹⁸F]F-K₂₂₂.

Afin de récupérer et de recycler la cible d'eau
 25 [¹⁸O], on lui fait traverser une résine échangeuse
 d'anions (AG1x8, de Bio-Rad, 100-200 mesh). L'ion
 fluorure [¹⁸F] est alors élué de la résine, en utilisant
 1,0 mL d'une solution aqueuse de K₂CO₃ à 4,5 mg/mL.

Après addition de 11,0 à 15,0 mg de KRYPTOFIX® K₂₂₂
 30 (4, 7, 13, 16, 21,
 24-hexaoxa-1,10-diazobicyclo[8.8.8]hexacosane), la
 solution résultante est alors doucement concentrée
 jusqu'à siccité à 145-150°C, sous un courant d'azote

pendant 10 minutes pour donner un complexe $K[^{18}F]F-K_{222}$, pur, sous la forme d'un résidu blanc semi-solide.

b) 1-[3-(2-[^{18}F]fluoro-pyridin-3-yloxy)-propyl]-pyrrole-2,5-dione.

Du DMSO, fraîchement distillé (600 μ L), contenant 4,0 à 6,0 mg du précurseur de marqueur « nitro. » (ester de tertibutyle de l'acide [3-(2-nitro-pyridin-3-yloxy)-propyl]-carbamique) est ajouté directement dans le tube contenant le complexe $K[^{18}F]-K_{222}$ séché. Le tube (non scellé) est alors placé dans un bloc de chauffage (à 145°C pendant 4 minutes). Le tube est ensuite refroidi en utilisant un bain

15 glace/eau et la radioactivité restante est mesurée.

85 % à 95 % de l'activité initiale placée dans le récipient est encore présente. Le mélange réactionnel obtenu de couleur sombre, est alors analysé par radiochromatographie. Les rendements d'incorporation

20 sont calculés à partir du radiochromatogramme en CCM et sont définis par le rapport de surface du dérivé ester de tertibutyle de l'acide [3-(2-[^{18}F]fluoro-pyridin-3-yloxy)-propyl]-carbamique sur l'activité totale du ^{18}F fluor-18 (SiO_2 -CCM ;

25 éluant : EtOAc ; R_f : : 0,75 et R_f : ion fluorure [^{18}F] : 0,0). Le mélange réactionnel est dilué avec 1 mL d'eau et transféré sur une cartouche C18 Sep-pak (waters). Le tube est rincé 2 fois avec 1 mL d'eau, qui est également transférée et ajoutée au mélange

30 réactionnel dilué sur la cartouche.

On fait ensuite passer l'ensemble à travers la cartouche. La cartouche est lavée avec 3 mL d'eau et

séchée en partie pendant 0,5 minute, en envoyant un courant d'azote.

Le dérivé de l'ester de tertibutyle de l'acide [3-(2-[^{18}F]fluoro-pyridin-3-yloxy)-propyl]-carbamique

5 ~~est élué à partir de la cartouche avec 3 mL de~~
dichlorométhane dans une fiole de réaction contenant
0,1 mL de TFA. On utilise 2 fois 1 mL de
dichlorométhane pour laver la cartouche et pour
transférer complètement le dérivé marqué au [^{18}F]
10 mentionné ci-dessus (5 % de la quantité de
radioactivité totale, impliquée dans le processus de
fluoruration, reste sur la cartouche). Le rendement
d'incorporation est également confirmé après l'élution
du Sep-pak par le rapport des valeurs de comptage du
15 CH_2Cl_2 sur radioactivité totale éluee ($\text{DMSO}/\text{H}_2\text{O}+\text{CH}_2\text{Cl}_2$).
La solution résultante $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{TFA}$ (50/1, V/V) est
concentrée à siccité (à 65-75°C) sous un courant
d'azote modéré pendant 4 à 6 minutes). Le rendement de
la déprotection est quantitatif : Nulle molécule,
20 décrite ci-dessus, protégée par BOC ne peut être
détecté par radiochromatographie. Le résidu, ci-dessus,
est redissous dans 2 mL de CH_2Cl_2 et concentré de
nouveau à siccité pour minimiser la présence de TFA (à
65-75°C sous un courant modéré d'azote pendant 4 à 6
25 minutes). Le résidu est alors dilué avec 0,5 mL de
xylène contenant 25 mg de N-méthoxycarbonylmaléimide.
Le récipient est alors hermétiquement fermé, chauffé
pendant 5 minutes à 190°C (fort reflux), puis refroidi
pendant 2 minutes, en utilisant un bain glace/eau. Le
30 mélange réactionnel est alors injecté sur une colonne
de HPLC semi-préparative. Elution isocratique [éluant :
heptane/EtOAc : 50/50 ; débit : 6,0 mL/minute] qui
donne
de
la

1-(3-(2-[¹⁸F]fluor-pyridin-3-yloxy)-propyl)-pyrrole-2,5-dione marquée, pure, temps de rétention : 7,5 à 8,0 minutes.

Typiquement, 60 à 70 mCi de
5 1-(3-(2-[¹⁸F]fluor-pyridin-3-yloxy)-propyl)-pyrrole-2,5-dione marquée, pure, peuvent être obtenus en 75 à 85 minutes, à partir de 550-650 mCi d'un lot de production [¹⁸F]F⁻ d'un cyclotron.

10 Exemple 6 : Marquage d'un peptide de la présente invention par la fluorescéine

Cet exemple, ainsi que l'exemple 7 suivant, ont pour but de démontrer l'efficacité de reconnaissance de sites apoptotiques par les peptides de la présente
15 invention.

Dans les exemples qui suivent, le peptide de la présente invention est appelé AFIM-SH. Il a une séquence peptidique telle que définie par la séquence (PI). Les séquences IDn°1 à IDn°14 sont testées.

20 La fluorescéine est une molécule qui émet une fluorescence verte d'une longueur d'onde de 525 nm lorsqu'elle est excitée à une longueur d'onde de 488 nm. L'émission de lumière verte est détectée par des caméras ou des photomultiplicateurs. Ce couplage
25 d'AFIM à la fluorescéine permet de détecter la présence des cellules présentant la PS aussi bien *in vitro* que *in vivo* chez des petits animaux.

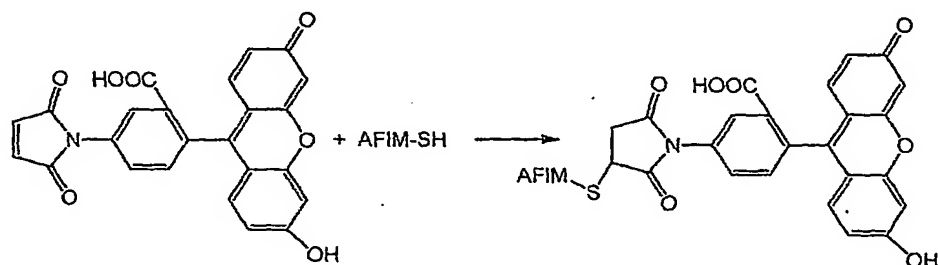
Selon la présente invention, il est possible de marquer AFIM au niveau des résidus de surface sur toute
30 cystéine qui serait introduite à la place de n'importe quel acide aminé présent à la surface d'AFIM (résidus de surface) pour autant que la fonction de liaison aux

membranes lipidiques ne soit pas perturbée. AFIM ainsi modifié est désigné AFIM-SH ci-dessous.

Le couplage de la fluorescéine se fait par l'intermédiaire d'une fonction maléimide représentée
5 ~~ci-dessous sur AFIM par la fonction SH.~~

La fluorescéine est couplée à une ou plusieurs cystéine(s) de la séquence, de manière covalente, en utilisant une fonction maléimide.

10 Schéma général du marquage (schéma I):



Tout le marquage se fait à une température
15 inférieure à 20°C.

AFIM-SH est en solution dans du tampon Tris (50 mM), NaCl (150 mM), pH = 7.4. 5 équivalents de DTT en solution dans le même tampon sont additionnés à la solution de AFIM-SH. Le milieu est agité durant 30 min.

20 A l'abri de la lumière: la fluorescéine (5 équivalents d'AFIM-SH + 2 équivalents de DTT) est pesée et dissoute dans du DMF, et additionnée à la solution précédente. Le tout est agité, et la réaction est poursuivie 30 min. Puis le milieu est dilué dans 150 ml
25 de tampon PBS (Phosphate 20 mM, NaCl 150 mM), pH = 7.4, et ultra-filtré sur membrane YM3 (marque de commerce). L'échantillon est re-dilué et ultra-filtré plusieurs fois, en faisant le spectre UV du filtrat.

Lorsqu'il n'y a plus de fluorescéine dans le filtrat (pic à 490 nm), l'échantillon est concentré à quelques ml et conservé au frais à 4°C.

5 Les produits AFIM-Fluorescéine ont été employés pour détecter des cellules apoptotiques en cytométrie de flux *in vitro*, ainsi que chez des animaux *in vivo* de la manière décrite dans l'exemple 7 suivant.

10 Exemple 7 : Résultats de marquages de cellules apoptotiques par les produits AFIM-Fluorescéine de l'exemple 6

Imagerie de cellules cardiaques apoptotiques après un infarctus chez le rat.

15 Un modèle d'apoptose chez le rat est utilisé comme il est décrit dans l'article paru dans *Circulation Res.* 1996, 79, 946-956.

Brièvement, quatre rats (300 g chacun) ont été anesthésiés, intubés et ventilés. L'ischémie du myocarde fut provoquée par une occlusion temporaire de 20 l'artère coronaire. Après 30 minutes d'occlusion, l'artère coronaire fut re-perfusée pendant une heure.

A la fin de la période de re-perfusion, les peptides AFIM-Fluorescéine de l'exemple 6 ont été 25 injectés dans la veine jugulaire à raison de 200 µg de peptide pour chacun de deux des rats dans un volume total de 1 ml.

A titre comparatif, 200µg d'annexine 5-Fluorescéine (composés de l'art antérieur) ont été 30 injectés dans les mêmes conditions pour chacun des deux autres rats dans un volume total de 1 ml.

Les rats ont été sacrifiés après 60 minutes.

Cinq organes ont été conservés pour cette étude: le cœur, le poumon, le rein, le foie et le cerveau. Il ont été lavés et rincés en présence de formol. Les organes ont ensuite été déshydratés et imprégnés de paraffine pendant environ 12 heures puis des coupes de 7 μ m furent effectuées.

Quelques coupes furent colorées à l'hématoxyline. Les coupes ont été examinées au microscope à fluorescence et les coupes adjacentes colorées à l'hématoxyline furent examinées avec un microscope en lumière visible. Les coupes colorées à l'hématoxyline (marquées H1 et H2 respectivement sur les figures 1 et 2 annexées) permettent une visualisation de l'architecture des tissus et la microscopie de fluorescence de détecter le marquage par AFIM-Fluorescéine (AFIM-F) ou par l'annexine 5-Fluorescéine (A5-F).

La figure 1 annexée montre les images obtenues pour le cœur apoptotique et la figure 2 annexée montre les images obtenues pour le rein.

La figure 1 montre clairement l'excès de fluorescence correspondant à l'accumulation de marqueur au niveau des cellules apoptotiques. Le contraste est visiblement bien meilleur avec AFIM de la présente invention qu'avec l'annexine 5 de l'art antérieur.

La figure 2 montre le marquage du rein lié à l'élimination partielle des produits. Dans le cas de AFIM les glomérules ne semblent pas marqués, seule les tubules proximaux sont partiellement marqués. Par contre dans le cas de l'annexine 5 de l'art antérieur l'ensemble du tissu rénal est fortement marqué, ce qui est en accord avec la toxicité rénale observée pour cette protéine.

Les résultats obtenus dans cet exemple démontrent une grande spécificité des peptides de la présente invention pour le marquage des cellules.

Le marquage du peptide AFIM, par exemple de IDn°1 à 10, par la fluorescéine permet donc de détecter efficacement la phosphatidylsérine (PS) présente à la surface externe des cellules impliquées dans des processus physiopathologiques comme la mort cellulaire programmée (apoptose) la coagulation du sang, la réaction inflammatoire.

Exemple 8 : marquage suivant le procédé de la présente invention de peptides comprenant la séquence (PII) par le composé de marquage (CI)

Dans les exemples qui suivent, le peptide de la présente invention est appelé AFIM-SH. Il a une séquence peptidique telle que définie par la séquence (PII). Les séquences IDn°1 à IDn°14 de la liste de séquences annexées sont testées. Le composé de marquage appelé synthon ^{18}F fabriqué dans l'exemple 5 est utilisé dans cet exemple.

AFIM est couplé, spécifiquement au niveau d'une fonction SH de la cystéine J° au synthon ^{18}F .

Le schéma général du marquage peut être résumé de la manière suivante :



AFIM-SH est en solution dans du tampon Tris (50mM), NaCl (150 mM), pH=7.4. Le synthon ^{18}F est dissout dans un mélange acétonitrile-méthanol (2/1 v/v), et AFIM-SH est ajouté. Le tout est agité, et la

5 réaction est poursuivie 3 minutes à température ambiante.

Le milieu réactionnel est ensuite transféré sur une colonne de billes maléimide suspendues dans du DMF, et élué avec du tampon PBS.

10 Le milieu est purifié par HPLC sur colonne de gel d'exclusion, et élué dans du tampon PBS (20mM KH_2PO_4 , 150mM NaCl, pH = 7.4).

Le produit, une fois purifié est injecté par voie intraveineuse à des rats.

15

REVENDICATIONS

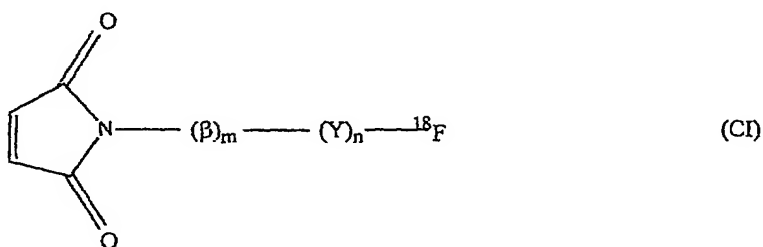
1. Peptide marqué par le Fluor-18 caractérisé en ce qu'il comprend la séquence peptidique (PI)
5 suivante :

J¹-J²-J³-J⁴-J⁵-J⁶-Z⁷-U⁸-J⁹-J¹⁰-U¹¹-Arg-J¹³-J¹⁴-U¹⁵-Lys-
Gly-X¹⁸-Gly-Thr-J²¹-Glu-J²³-J²⁴-U²⁵-J²⁶-J²⁷-J²⁸-U²⁹-J³⁰-J³¹-
Arg-J³³-J³⁴-J³⁵-J³⁶-B³⁷-J³⁸-J³⁹-U⁴⁰-J⁴¹-J⁴²-J⁴³-U⁴⁴-J⁴⁵-J⁴⁶-J⁴⁷-
10 J⁴⁸-J⁴⁹-Arg-J⁵¹-U⁵²-J⁵³-J⁵⁴-Asp-U⁵⁶-Lys-Ser-Z⁵⁹-Leu-J⁶¹-J⁶²-
J⁶³-J⁶⁴-Z⁶⁵-J⁶⁶-J⁶⁷-U⁶⁸-J⁶⁹-J⁷⁰-J⁷¹-U⁷²-J⁷³-J⁷⁴-J⁷⁵ (I)

dans laquelle J, Z, U, X et B représentent des acides aminés tels que :

- 15 - les acides aminés J sont choisis indépendamment les uns des autres parmi les acides aminés naturels, ou des dérivés de ceux-ci, de telle manière qu'au moins 50% d'entre eux sont des résidus polaires choisis parmi Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Lys, Orn, Pro, Ser, Thr et Tyr,
- les acides aminés U sont choisis parmi Ala, Cys, Gly, Ile, Leu, Met, Phe, Trp, Tyr et Val,
- l'acide aminé X¹⁸ est choisi indépendamment des autres acides aminés de la séquence parmi Ala, Asn, Cys, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Met, Phe, Ser, Thr, Trp, Tyr et Val,
- 25 - l'acide aminé B³⁷ est choisi indépendamment des autres acides aminés de la séquence parmi Arg, Ala, Cys, Gly, Ile, Leu, Met, Phe, Trp, Tyr et Val,
- 30 - l'acide aminé Z⁷ est choisi indépendamment des autres acides aminés de la séquence parmi Asp et Glu,
- les acides aminés Z⁵⁹ et Z⁶⁵ sont choisis indépendamment parmi Glu, Asp, Lys et Arg,

les exposants des J, Z, U, X et B représentant la position de ces acides aminés dans ladite séquence, ledit peptide étant marqué directement ou indirectement avec un composé (CI) de formule générale :



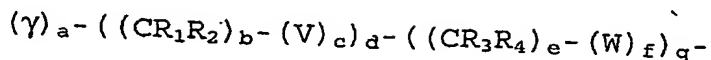
dans laquelle :

- m représente un nombre entier de 0 à 10, tel que 0, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 ;
- n représente un nombre entier de 0 à 10, tel que 0, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 ;
- Y représente un groupe choisi parmi les groupes alkyle, les groupes hétérocycliques monocycliques ou bicycliques choisis parmi les groupes imidazolyle, pyrazolyle, benzimidazolyle, pyridinyle, piridazinyle, pyrimidinyle, pyrazinyle, triazinyle, quinolinyle, isoquinolinyle, cinnolinyle, quinazolinyle, quinoxalinyle, purinyle, Y pouvant être, éventuellement, substitué par un ou plusieurs substituants, chacun de ces substituants étant indépendamment choisi parmi l'hydrogène, les halogènes, les groupes phényle, alkyle en C_{1-6} , alcoxy en C_{1-6} , aryloxy, amino, mono- ou di(alkyle en C_{1-6})amino, mono- ou di(aryl)amino, thio, alkyle en C_{1-6} -thio, arylthio, formyle, alkyle en C_{1-6} -carbonyle, arylcarbonyle, carbonyle, alcoxy en C_{1-6} -carbonyle, aryloxycarbonyle, alkyle en

C₁₋₆-aminocarbonyle,
trifluorométhyle ;

arylamino-carbonyle,

- β représente un radical de
formule :



dans laquelle :

- a, b, c, d, e, f, g représentent
chacun indépendamment un nombre entier de 0 à 10,
tel que 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ;

- γ, V et W représentent chacun

indépendamment -NR₁-, -O-, -S-, $\overset{\text{O}}{\parallel} \text{N}-$, éthyne, —N— ,
-CR₁=CR₂-, -(C=O)-, -(C=S)-, -C(=NR₁)-, -C(=O)O-,
-(C=S)S-, -C(=NR₁)NR₂-, -CR₁R₂-, -CR₁OR₂-, -CR₁NR₂R₃-,
où R₁, R₂, R₃ et R₄ sont chacun indépendamment
choisis parmi l'hydrogène, les halogènes, les
groupes phényle, alkyle en C₁₋₆, alcoxy en C₁₋₆,
aryloxy, amino, mono- ou di(alkyle en C₁₋₆)amino,
mono- ou di(aryl)amino, thio, alkyle en C₁₋₆-thio,
arylthio, formyle, alkyle en C₁₋₆-carbonyle,
arylcabonyle, carbonyle alcoxy en C₁₋₆-carbonyle,
aryloxycarbonyle, alkyle en C₁₋₆-aminocarbonyle,
arylamino-carbonyle, trifluorométhyle, directement
ou indirectement sur une fonction -SH.

2. Peptide marqué par le Fluor-18 selon la
revendication 1, dans lequel les acides aminés J sont
choisis indépendamment les uns des autres parmi Ala,
Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys,
Met, Phe, Pro, Ser, Thr Trp, Tyr et Val de telle

manière que au moins 50% d'entre eux sont des résidus polaires choisis parmi Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Lys, Pro, Ser et Thr.

5 3. Peptide marqué par le Fluor-18 selon la revendication 1, dans lequel les acides aminés U et B de la séquence (PI) sont choisis suivant un des exemples a) à j) exposés dans le tableau 1 suivant :

	U ⁸	U ¹¹	U ¹⁵	U ²⁵	U ²⁹	B ³⁷	U ⁴⁰	U ⁴⁴	U ⁵²	U ⁵⁶	U ⁶⁸	U ⁷²
Ex a)	Val	Leu	Met	Ile	Leu	Arg	Ile	Tyr	Leu	Leu	Val	Leu
Ex b)	Ala	Ile	Ile	Ile	Leu	Arg	Ile	Tyr	Leu	Leu	Ile	Leu
Ex c)	Ala	Ile	Ile	Ile	Leu	Arg	Ile	Tyr	Leu	Leu	Met	Val
Ex d)	Ala	Leu	Met	Leu	Leu	Arg	Ile	Tyr	Leu	Leu	Ile	Met
Ex e)	Ala	Leu	Met	Ile	Ile	Arg	Val	Tyr	Leu	Leu	Ile	Met
Ex f)	Ala	Leu	Met	Ile	Ile	Arg	Ile	Phe	Leu	Leu	Ile	Met
Ex g)	Ala	Leu	Met	Ile	Val	Arg	Ile	Phe	Leu	Leu	Ile	Phe
Ex h)	Val	Leu	Met	Ile	Leu	Arg	Ile	Phe	Leu	Leu	Ile	Met
Ex i)	Ala	Leu	Met	Ile	Leu	Arg	Ile	Phe	Leu	Leu	Ile	Met
Ex j)	Ala	Leu	Met	Ile	Leu	Arg	Ile	Tyr	Leu	Leu	Ala	Ala

10 (Ex = exemple)

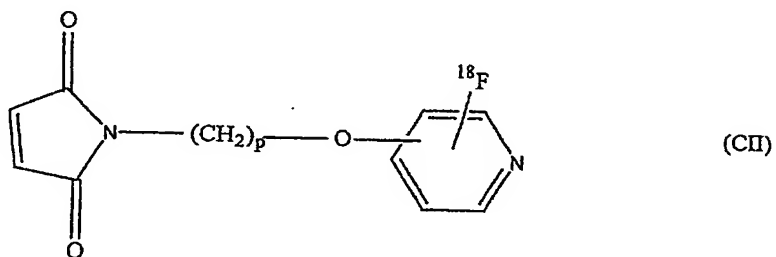
4. Peptide marqué par le Fluor-18 selon la revendication 1, dans lequel la séquence peptidique est choisie parmi la séquence IDn°1, IDn°2, IDn°3, IDn°4,
 15 IDn°5, IDn°6, IDn°7, IDn°8, IDn°9, IDn°10, IDn°11,

IDn°12, IDn°13 et IDn°14 de la liste de séquences annexée.

5. Peptide marqué au Fluor-18 selon l'une
5 quelconque des revendications 1 à 4, comprenant en
outre, liée à son extrémité N-terminal, la séquence
d'acides aminés choisie parmi Gly-Ser-Cys et
Gly-Cys-Ser.
- 10 6. Peptide marqué au Fluor-18 selon l'une
quelconque des revendications 1 à 4, comprenant en
outre, liée à son extrémité N-terminale, une séquence
d'acides aminés choisie parmi Gly-Ser-Gly-Cys,
Gly-Cys-Gly-Ser, et Gly-Cys-Gly-Cys.
- 15 7. Peptide marqué par le Fluor-18 selon l'une
quelconque des revendications 1 à 6, dans lequel le
peptide est marqué directement avec le composé (CI) par
couplage de la fonction maléimide du composé (CI) avec
20 une fonction -SH libre dudit peptide, par exemple la
fonction thiol d'une cystéine du peptide.
- 25 8. Peptide marqué par le Fluor-18 selon l'une
quelconque des revendications 1 à 6, dans lequel le
peptide est marqué directement avec le composé (CI) par
couplage de la fonction maléimide du composé (CI) avec
une fonction -SH libre de la séquence peptidique (PI),
par exemple la fonction thiol d'une cystéine de la
séquence peptidique.
- 30 9. Peptide marqué par le Fluor-18 selon l'une
quelconque des revendications 1 à 6, dans lequel, dans le

composé de formule (CI), $n=1$, et Y est un groupe 3-pyridinyle.

10. Peptide marqué par le Fluor-18 selon la revendication 9, dans lequel le composé (CI) répond à la formule (CII) suivante :



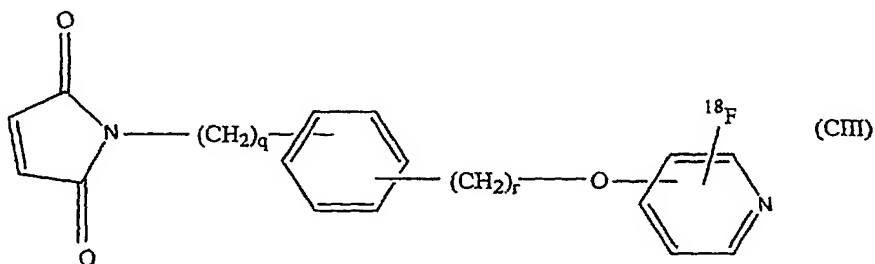
10 dans laquelle p est un nombre entier de 1 à 10, tel que 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou 9.

11. Peptide marqué par le Fluor-18 selon la revendication 10 dans lequel le composé de formule (CII) est choisi parmi :

- la 1-[2-(2-[^{18}F]fluoro-pyridin-3-yloxy)-éthyl]-pyrrole-2,5-dione ;
- la 1-[4-(2-[^{18}F]fluoro-pyridin-3-yloxy)-butyl]-pyrrole-2,5-dione ;
- 20 - la 1-[5-(2-[^{18}F]fluoro-pyridin-3-yloxy)-pentyl]-pyrrole-2,5-dione ;
- la 1-[6-(2-[^{18}F]fluoro-pyridin-3-yloxy)-hexyl]-pyrrole-2,5-dione ;
- la 1-[(2-[^{18}F]fluoro-pyridin-3-yloxy)-méthyl]-pyrrole-2,5-dione ;
- 25 - la 1-[3-(2-[^{18}F]fluoro-pyridin-3-yloxy)-propyl]-pyrrole-2,5-dione.

12. Peptide marqué par le Fluor-18 selon la revendication 9 dans lequel le composé de formule (CI) répond à la formule (CIII) suivante :

5



dans laquelle q et r représentent indépendamment un nombre entier de 0 à 10, tels que 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9.

10

13. Peptide marqué par le Fluor-18 selon la revendication 12 dans lequel le composé de formule (CIII) est choisi parmi :

15

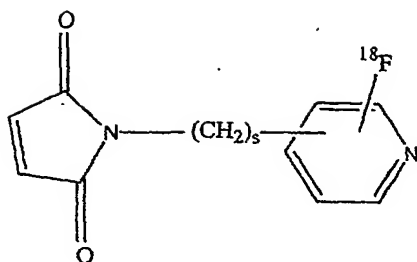
- la 1-{4-[2-(2-[¹⁸F]fluoro-pyridin-3-yloxy)-ethyl]-phenyl}-pyrrole-2,5-dione ;
- la 1-[4-(2--[¹⁸F]fluoro-pyridin-3-yloxymethyl)-phenyl]-pyrrole-2,5-dione ;
- la 1-[4-(2--[¹⁸F]fluoro-pyrridin-3-yloxymethyl)-benzyl]-pyrrole-2,5-dione.

20

14. Peptide marqué par le Fluor-18 selon la revendication 9 dans lequel le composé de formule (CI) répond à la formule (CIV) suivante :

25

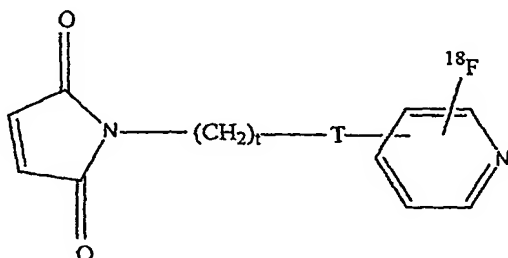
61



(CIV)

15. Peptide marqué par le Fluor-18 selon la
 5 revendication 14, dans lequel le composé de formule
 (CIV) est la 1-[3-(6-[^{18}F]fluoro-pyridin-3-yl)-
 propyl]-pyrrole-2,5-dione.

16. Peptide marqué par le Fluor-18 selon la
 10 revendication 9 dans lequel le composé de formule (CI)
 répond à la formule (CV) suivante :



(CV)

15 dans laquelle t est un nombre entier de 0 à 10,
 tel que 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 et T est un groupe
 $-CH=CH-$ ou $-C\equiv C-$.

17. Peptide marqué par le Fluor-18 selon la
 20 revendication 16, dans lequel le composé (CV) est
 choisi parmi :

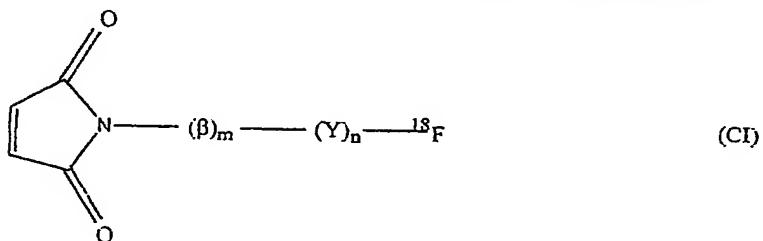
- la 1-[3-(6-[^{18}F]fluoro-pyridin-3-yl)-allyl]-
 pyrrole-2,5-dione ;

- la 1-[3-(6-[^{18}F]fluoro-pyridin-3-yl)-prop-2-ynyl]-pyrrole-2,5-dione.

18. Peptide marqué par le Fluor-18 selon l'une
 5 ~~quelconque des revendications 1 à 6,~~
 dans lequel la séquence peptidique est choisie parmi la
 séquence IDn°1, IDn°2, IDn°3, IDn°4, IDn°5, IDn°6,
 IDn°7, IDn°8, IDn°9, IDn°10, IDn°11, IDn°12, IDn°13 et
 IDn°14 de la liste de séquences annexée,
 10 dans lequel le composé (CI) est choisi parmi :
- la 1-[3-(6-[^{18}F]fluoro-pyridin-3-yl)-allyl]-pyrrole-2,5-dione ;
 - la 1-[3-(6-[^{18}F]fluoro-pyridin-3-yl)-prop-2-ynyl]-pyrrole-2,5-dione.

15

19. Procédé de synthèse d'un peptide marqué par un halogène radioactif selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, comprenant une étape d'addition d'un composé (CI) de formule générale :



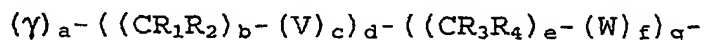
20

dans laquelle :

- m représente un nombre entier de 0 à 10, tel que 0, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 ;
- 25 - n représente un nombre entier de 0 à 10, tel que 0, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 ;
- Y représente un groupe choisi parmi les groupes alkyle, les groupes hétérocycliques monocycliques ou bicycliques choisis parmi les

groupes imidazole, pyrazole, benzimidazole, pyridinyle, piridazinyle, pyrimidinyle, pyrazinyle, triazinyle, quinolinyle, isoquinolinyle, cinnolinyle, quinazolinyle, quinoxalinyle, purinyle, Y pouvant être, éventuellement, substitué par un ou plusieurs substituants, chacun de ces substituants étant indépendamment choisi parmi l'hydrogène, les halogènes, les groupes phényle, alkyle en C₁₋₆, alcoxy en C₁₋₆, aryloxy, amino, mono- ou di(alkyle en C₁₋₆)amino, mono- ou di(aryl)amino, thio, alkyle en C₁₋₆-thio, arylthio, formyle, alkyle en C₁₋₆-carbonyle, arylcarbonyle, carbonyle, alcoxy en C₁₋₆-carbonyle, aryloxycarbonyle, alkyle en C₁₋₆-aminocarbonyle, arylaminocarbonyle, trifluorométhyle ;

β représente un radical de formule :



dans laquelle :

- a, b, c, d, e, f, g représentent chacun indépendamment un nombre entier de 0 à 10, tel que 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ;

- γ , V et W représentent chacun

indépendamment -NR₁-, -O-, -S-, $\text{---}\overset{\text{O}}{\underset{|}{\text{N}}}\text{---}$, éthyne, -CR₁=CR₂-, -(C=O)-, -(C=S)-, -C(=NR₁)-, -C(=O)O-, -(C=S)S-, -C(=NR₁)NR₂-, -CR₁R₂-, -CR₁OR₂-, -CR₁NR₂R₃-, où R₁, R₂, R₃ et R₄ sont chacun indépendamment choisis parmi l'hydrogène, les halogènes, les groupes phényle, alkyle en C₁₋₆, alcoxy en C₁₋₆, aryloxy, amino, mono- ou di(alkyle en C₁₋₆)amino,

mono- ou di(aryl)amino, thio, alkyle en C₁₋₆-thio, arylthio, formyle, alkyle en C₁₋₆-carbonyle, arylcarbonyle, carbonyle alcoxy en C₁₋₆-carbonyle, aryloxycarbonyle, alkyle en C₁₋₆-aminocarbonyle,

~~5~~ arylaminocarbonyle, trifluorométhyle ;

directement ou indirectement sur une fonction -SH d'un peptide.

20. Procédé selon la revendication 19, dans
10 lequel l'addition est effectuée directement sur une fonction -SH libre de la séquence peptidique (PI) ; par exemple la fonction thiol d'une cystéine de la séquence peptidique.

15 21. Trousse d'analyse et de détection de charges négatives à la surface de cellules, caractérisée en ce qu'elle comprend un peptide marqué par le Fluor-18 selon l'une quelconque des revendications 1 à 18.

20 22. Trousse de diagnostic comprenant un peptide marqué par le Fluor-18 selon l'une quelconque des revendications 1 à 18.

25 23. Trousse d'analyse et de détection de microvésicules dans le sang, caractérisée en ce qu'elle comprend un peptide marqué par le Fluor-18 selon l'une quelconque des revendications 1 à 18.

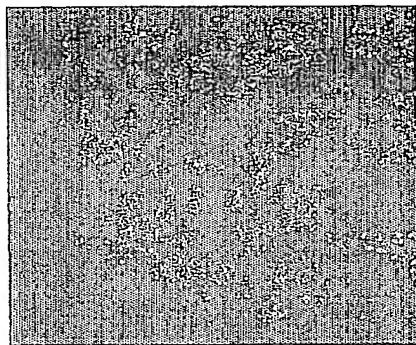
30 24. Utilisation d'un peptide marqué par le Fluor-18 selon l'une quelconque des revendications 1 à 18 pour la fabrication d'un produit destiné à la détection de centres exposant des lipides chargés

négativement à la surface de cellules et/ou la libération dans le sang de microvésicules.

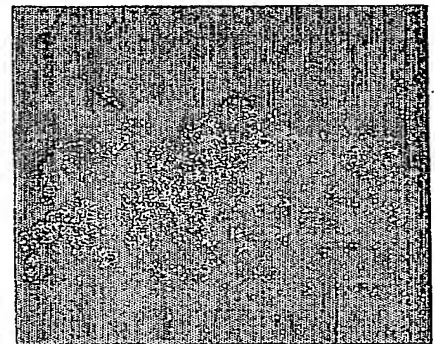
25. Utilisation selon la revendication 24, dans
5 laquelle la détection est une détection au moyen d'images scintigraphiques acquises en tomographie par émission de positons (TEP).

26. Composition pour l'analyse et la détection
10 par exemple par tomographie par émission de positons (TEP) ayant un peptide marqué par le Fluor-18 selon l'une quelconque des revendications 1 à 18 et un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

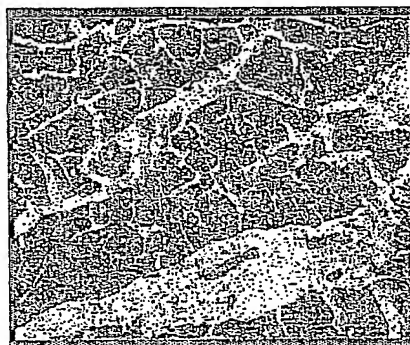
15 27. Composition pour le diagnostic comprenant un peptide marqué par le Fluor-18 selon l'une quelconque des revendications 1 à 18 et un véhicule pharmaceutiquement acceptable.



AFM-F



A5-F



H1

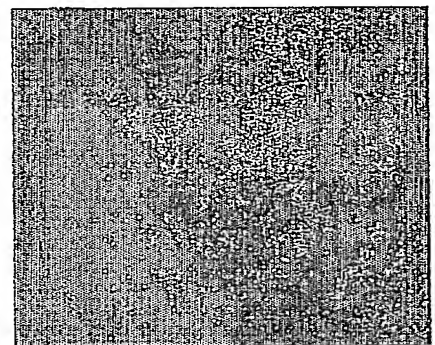
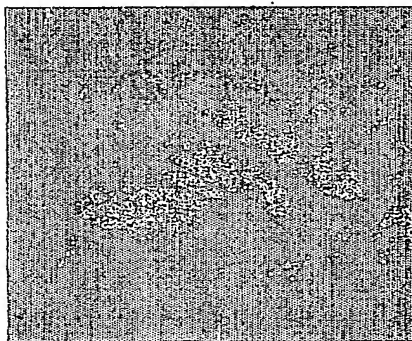
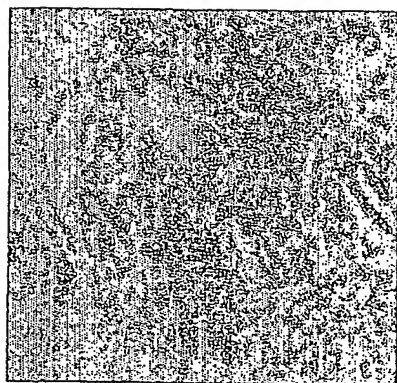
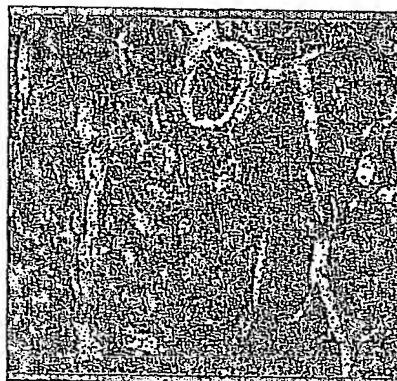


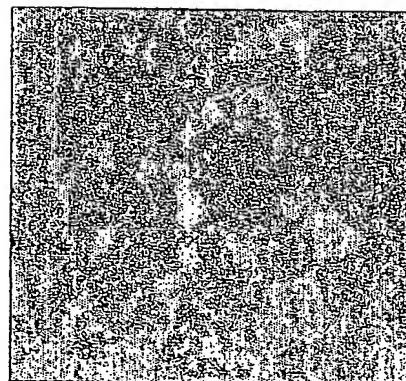
Fig. 1



AFM-F



H
2



A5-F

Fig. 2

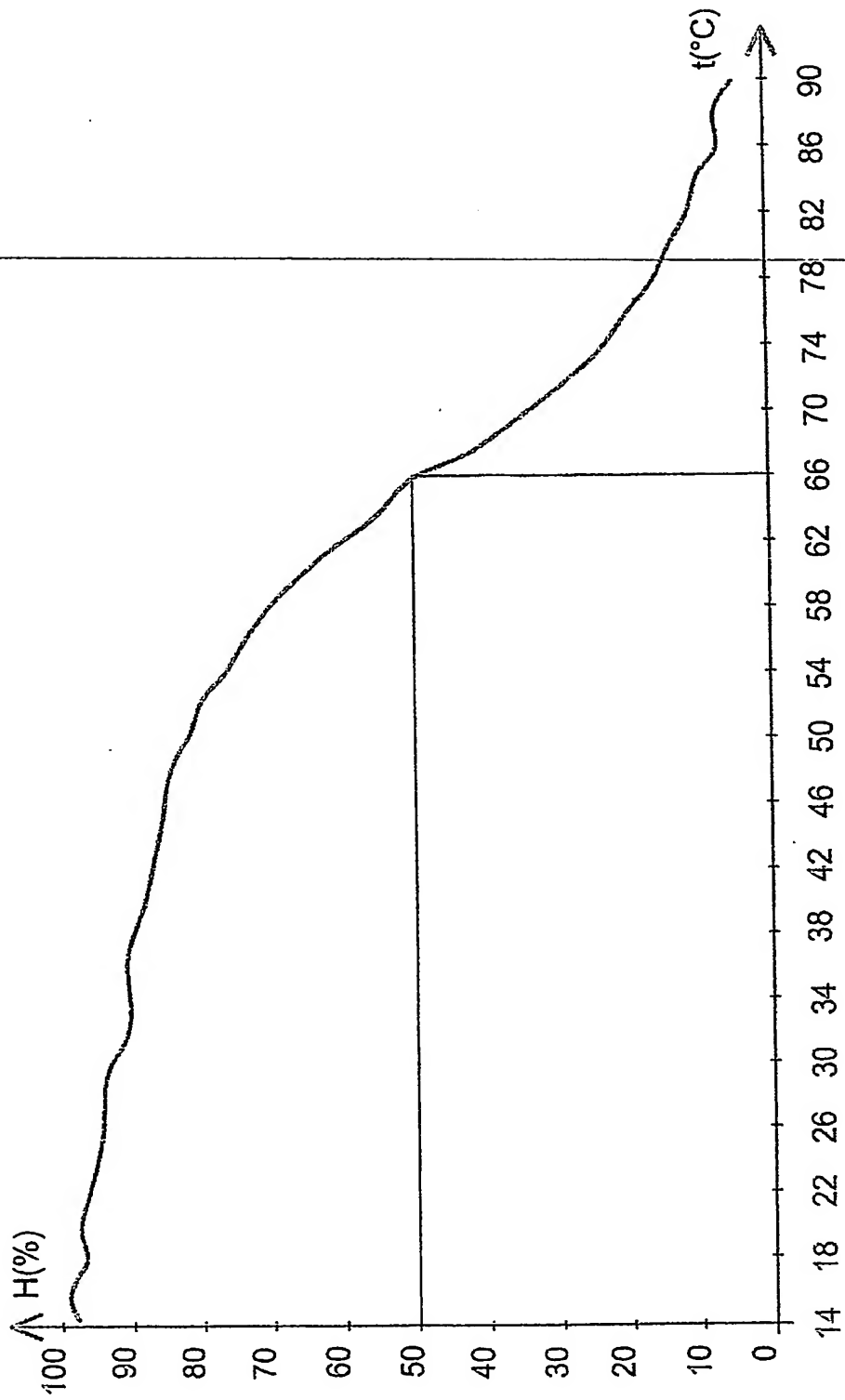


FIG. 3

LISTE DE SEQUENCES

<110> COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE
UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE (PARIS VI)

<120> PEPTIDES MARQUE AYANT UNE AFFINITE POUR UN
PHOSPHOLIPIDE ET UTILISATIONS

<130> B14023EE

<140>

<141>

<160> 14

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 75

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: séquence
dérivée d'une annexine humaine

<400> 1

Gly Phe Asp Glu Arg Ala Asp Val Glu Thr Leu Arg Lys Ala Met Lys
1 5 10 15

Gly Leu Gly Thr Asp Glu Glu Ser Ile Leu Thr Leu Leu Thr Ser Arg
20 25 30

Ser Asn Ala Gln Arg Gln Glu Ile Ser Ala Ala Tyr Lys Thr Leu Phe
35 40 45

Gly Arg Asp Leu Leu Asp Asp Leu Lys Ser Glu Leu Thr Gly Lys Phe
50 55 60

Glu Lys Leu Val Val Ala Leu Leu Lys Pro Ser
65 70 75

<210> 2

<211> 75

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: séquence
dérivée d'une annexine humaine

<400> 2

Asn Phe Asp Ala Glu Arg Asp Ala Leu Asn Ile Arg Lys Ala Ile Lys
1 5 10 15

~~Gly Met Gly Val Asp Glu Asp Thr Ile Val Asn Ile Leu Thr Asn Arg~~
20 25 30

Ser Asn Ala Gln Arg Gln Asp Ile Ala Phe Ala Tyr Gln Arg Arg Thr
35 40 45

Lys Arg Glu Leu Ala Ser Asp Leu Lys Ser Glu Leu Ser Gly His Leu
50 55 60

Glu Arg Val Ile Leu Gly Leu Leu Lys Thr Ser
65 70 75

<210> 3

<211> 75

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: séquence
dérivée d'une annexine humaine

<400> 3

Asp Phe Ser Pro Ser Val Asp Ala Glu Ala Ile Arg Lys Ala Ile Lys
1 5 10 15

Gly Ile Gly Thr Asp Glu Asp Met Leu Ile Ser Ile Leu Thr Glu Arg
20 25 30

Ser Asn Ala Gln Arg Gln Leu Ile Val Lys Glu Tyr Gln Ala Ala Tyr
35 40 45

Gly Arg Glu Leu Lys Asp Asp Leu Lys Ser Glu Leu Ser Gly His Phe
50 55 60

Glu Arg Leu Met Val Ala Leu Val Thr Pro Ser
65 70 75

<210> 4

<211> 75

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: séquence
dérivée d'une annexine humaine

<400> 4

Gly	Phe	Asn	Ala	Met	Glu	Asp	Ala	Gln	Thr	Leu	Arg	Lys	Ala	Met	Lys
1				5					10					15	

Gly	Leu	Gly	Thr	Asp	Glu	Asp	Ala	Ile	Ile	Ser	Val	Leu	Ala	Tyr	Arg
			20					25					30		

Asn	Thr	Ala	Gln	Arg	Gln	Glu	Ile	Arg	Thr	Ala	Tyr	Lys	Ser	Thr	Ile
		35					40					45			

Gly	Arg	Asp	Leu	Ile	Asp	Asp	Leu	Lys	Ser	Glu	Leu	Ser	Gly	Asn	Phe
	50					55					60				

Glu	Arg	Val	Ile	Val	Gly	Met	Met	Thr	Pro	Ser
65					70				75	

<210> 5

<211> 75

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: séquence
dérivée d'une annexine humaine

<400> 5

Gly	Phe	Asp	Pro	Asn	Gln	Asp	Ala	Glu	Ala	Leu	Arg	Thr	Ala	Met	Lys
1				5					10					15	

Gly	Phe	Gly	Ser	Asp	Glu	Glu	Ala	Ile	Leu	Asp	Ile	Ile	Thr	Ser	Arg
			20					25					30		

Ser	Asn	Arg	Gln	Arg	Gln	Glu	Val	Cys	Gln	Ser	Tyr	Lys	Ser	Leu	Tyr
		35					40					45			

Gly	Arg	Asp	Leu	Ile	Ala	Asp	Leu	Lys	Ser	Glu	Leu	Thr	Gly	Lys	Phe
	50					55					60				

Glu	Arg	Leu	Ile	Val	Gly	Leu	Met	Arg	Pro	Ser
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

65

70

75

<210> 6

<211> 75

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: séquence
dérivée d'une annexine humaine

<400> 6

Gly Phe Asn Pro Asp Ala Asp Ala Lys Ala Leu Arg Lys Ala Met Lys
1 5 10 15

Gly Leu Gly Thr Asp Glu Asp Thr Ile Ile Asp Ile Ile Thr His Arg
20 25 30

Ser Asn Val Gln Arg Gln Gln Ile Arg Gln Thr Phe Lys Ser His Phe
35 40 45

Gly Arg Asp Leu Met Thr Asp Leu Lys Ser Glu Ile Ser Gly Asp Leu
50 55 60

Glu Arg Leu Ile Leu Gly Leu Met Met Pro Ser
65 70 75

<210> 7

<211> 75

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: séquence
dérivée d'une annexine humaine

<400> 7

Pro Gly Asp Ala Ile Arg Asp Ala Glu Ile Leu Arg Lys Ala Met Lys
1 5 10 15

Gly Phe Gly Thr Asp Glu Gln Ala Ile Val Asp Val Val Ala Asn Arg
20 25 30

Ser Asn Asp Gln Arg Gln Lys Ile Lys Ala Ala Phe Lys Thr Ser Tyr
35 40 45

Gly Arg Asp Leu Ile Lys Asp Leu Lys Ser Glu Leu Ser Gly Asn Met
50 55 60

Glu Arg Leu Ile Leu Ala Leu Phe Met Pro Ser
65 70 75

<210> 8

<211> 75

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: séquence
dérivée d'une annexine humaine

<400> 8

His Phe Asn Pro Asp Pro Asp Val Glu Thr Leu Arg Lys Ala Met Lys
1 5 10 15

Gly Ile Gly Thr Asn Glu Gln Ala Ile Ile Asp Val Leu Thr Lys Arg
20 25 30

Ser Asn Thr Gln Arg Gln Thr Ile Ala Lys Ser Phe Lys Ala Gln Phe
35 40 45

Gly Arg Asp Leu Thr Glu Asp Leu Lys Ser Glu Leu Ser Gly Lys Leu
50 55 60

Glu Arg Leu Ile Val Ala Leu Met Tyr Pro Ser
65 70 75

<210> 9

<211> 75

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: séquence
dérivée d'une annexine humaine

<400> 9

Gly Phe Asp Pro Leu Arg Asp Ala Glu Val Leu Arg Lys Ala Met Lys
1 5 10 15

Gly Phe Gly Thr Asp Glu Gln Ala Ile Ile Asp Cys Leu Gly Ser Arg
20 25 30

Ser Asn Lys Gln Arg Gln Gln Ile Leu Leu Ser Phe Lys Thr Ala Tyr
 35 40 45

Gly Arg Asp Leu Ile Lys Asp Leu Lys Ser Glu Leu Ser Gly Asn Phe
 50 55 60

Glu Lys Thr Ile Leu Ala Leu Met Lys Thr Ser
 65 70 75

<210> 10

<211> 75

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: séquence
 dérivée d'une annexine humaine

<400> 10

Gly Phe Asp Val Asp Arg Asp Ala Lys Lys Leu Arg Lys Ala Met Lys
 1 5 10 15

Gly Met Gly Thr Asn Glu Ala Ala Ile Ile Glu Ile Leu Ser Gly Arg
 20 25 30

Thr Ser Asp Glu Arg Gln Gln Ile Lys Gln Lys Tyr Lys Ala Thr Tyr
 35 40 45

Gly Arg Glu Leu Glu Glu Asp Leu Lys Ser Glu Leu Ser Gly Asn Phe
 50 55 60

Glu Lys Thr Ala Leu Ala Leu Leu Asp Arg Ser
 65 70 75

<210> 11

<211> 79

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: séquence
 dérivée d'une annexine humaine

<220>

<223> Xaa en position 22 est Leu, Met ou Trp

<220>

<223> Xaa en position 34 est Thr ou Lys

<220>

<223> Xaa en position 45 est Ser ou Lys

<220>

<223> Xaa en position 48 est Phe ou Tyr

<220>

<223> Xaa en position 50 est Thr ou Glu

<220>

<223> Xaa en position 63 est Glu ou Lys

<220>

<223> Xaa en position 69 est Glu ou Lys

<220>

<223> Xaa en position 71 est Glu ou Leu

<400> 11

Gly Ser Gly Cys Gly Phe Asp Glu Arg Ala Asp Val Glu Thr Leu Arg
1 5 10 15

Lys Ala Met Lys Gly Xaa Gly Thr Asp Glu Glu Ser Ile Leu Thr Leu
20 25 30

Leu Xaa Ser Arg Ser Asn Ala Gln Arg Gln Glu Ile Xaa Ala Ala Xaa
35 40 45

Lys Xaa Leu Phe Gly Arg Asp Leu Leu Asp Asp Leu Lys Ser Xaa Leu
50 55 60

Thr Gly Lys Phe Xaa Lys Xaa Val Val Ala Leu Leu Lys Pro Ser
65 70 75

<210> 12

<211> 78

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: séquence
dérivée d'une annexine humaine

<400> 12

Gly Ser Pro Gly Phe Asp Glu Arg Ala Asp Val Glu Thr Leu Arg Lys
1 5 10 15

Ala Met Lys Gly Leu Gly Thr Asp Glu Glu Ser Ile Leu Thr Leu Leu
20 25 30

Thr Ser Arg Ser Asn Ala Gln Arg Gln Glu Ile Ser Ala Ala Tyr Lys
35 40 45

Thr Leu Phe Gly Arg Asp Leu Leu Asp Asp Leu Lys Ser Glu Leu Thr
50 55 60

Gly Lys Phe Glu Lys Leu Val Val Ala Leu Leu Lys Pro Ser
65 70 75

<210> 13

<211> 83

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: séquence
dérivée d'une annexine humaine

<220>

<223> Xaa en position 25 est Leu, Met ou Trp

<220>

<223> Xaa en position 37 est Thr ou Lys

<220>

<223> Xaa en position 48 est Ser ou Lys

<220>

<223> Xaa en position 51 est Phe ou Tyr

<220>

<223> Xaa en position 53 est Thr ou Glu

<220>

<223> Xaa en position 66 est Glu ou Lys

<220>

<223> Xaa en position 72 est Glu ou Lys

<220>

<223> Xaa en position 74 est Glu ou Leu

<400> 13

Gly	Ser	Glu	Cys	Asp	Phe	Pro	Gly	Phe	Asp	Glu	Arg	Ala	Asp	Val	Glu
1				5					10					15	

Thr	Leu	Arg	Lys	Ala	Met	Lys	Gly	Xaa	Gly	Thr	Asp	Glu	Glu	Ser	Ile
			20					25						30	

Leu	Thr	Leu	Leu	Xaa	Ser	Arg	Ser	Asn	Ala	Gln	Arg	Gln	Glu	Ile	Xaa
		35						40					45		

Ala	Ala	Xaa	Lys	Xaa	Leu	Phe	Gly	Arg	Asp	Leu	Leu	Asp	Asp	Leu	Lys
		50				55						60			

Ser	Xaa	Leu	Thr	Gly	Lys	Phe	Xaa	Lys	Xaa	Val	Val	Ala	Leu	Leu	Lys
65					70					75					80

Pro Ser Arg

<210> 14

<211> 87

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: séquence
dérivée d'une annexine humaine

<220>

<223> Xaa en position 29 est Leu, Met ou Trp

<220>

<223> Xaa en position 41 est Tyr ou Lys

<220>

<223> Xaa en position 52 est Ser ou Lys

<220>

<223> Xaa en position 55 est Phe ou Tyr

<220>

<223> Xaa en position 57 est Thr ou Glu

<220>

<223> Xaa en position 70 est Glu ou Lys

<220>

<223> Xaa en position 76 est Glu ou Lys

<220>

<223> Xaa en position 78 est Glu ou Leu

<400> 14

Gly Ser Gly Cys Gly Thr Glu Thr Asp Phe Pro Gly Phe Asp Glu Arg
1 5 10 15

Ala Asp Val Glu Thr Leu Arg Lys Ala Met Lys Gly Xaa Gly Thr Asp
20 25 30

Glu Glu Ser Ile Leu Thr Leu Leu Xaa Ser Arg Ser Asn Ala Gln Arg
35 40 45

Gln Glu Ile Xaa Ala Ala Xaa Lys Xaa Leu Phe Gly Arg Asp Leu Leu
50 55 60

Asp Asp Leu Lys Ser Xaa Leu Thr Gly Lys Phe Xaa Lys Xaa Val Val
65 70 75 80

Ala Leu Leu Lys Pro Ser Arg
85

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1. / 1.

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 260899

Vos références pour ce dossier (facultatif)	B 14023.3/EE BD1405/UNIVERSITE
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL	02.08204 du 01.07.2002

TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)

PEPTIDES MARQUES AYANT UNE AFFINITE POUR UN PHOSPHOLIPIDE ET UTILISATIONS.

LE(S) DEMANDEUR(S) :

COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE
31/33 rue de la Fédération
75752 PARIS 15ème
Université Pierre et Marie CURIE (Paris VI)
4 Place Jussieu Tour Centrale
75252 PARIS CEDEX 05

DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).

Nom	SANSON		
Prénoms	Alain		
Adresse	Rue	2 avenue de la Villeneuve	
	Code postal et ville	91940	GOMETZ LE CHATEL

Société d'appartenance (facultatif)			
Nom	OCHSENBEIN		
Prénoms	Françoise		
Adresse	Rue	12 rue des Patriarches	
	Code postal et ville	75005	PARIS

Société d'appartenance (facultatif)			
Nom	DOLLE		
Prénoms	Frédéric		
Adresse	Rue	10 allée de Villeneuve	
	Code postal et ville	91940	GOMETZ LE CHATEL

DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) DU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)	
PARIS LE 03 Juillet 2002	
. AUDIER	
22-5/002	

Loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire.
garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record.**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINE(S) OR MARK(S) ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.